

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Fábio Arthur Mateus Conceição

**Regulação da expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* na via
de mTORC1**

***TSC1* and *TSC2* gene expression regulation in the mTORC1 pathway**

São Paulo

2024

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Fábio Arthur Mateus Conceição

Regulação da expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* na via de mTORC1

***TSC1* and *TSC2* gene expression regulation in the mTORC1 pathway**

EXEMPLAR CORRIGIDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Biológicas
(Biologia Genética)

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

São Paulo

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:
'<https://ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Mateus Conceição, Fábio Arthur
Regulação da expressão dos genes TSC1 e TSC2 na
via de mTORC1 / Mateus Conceição Fábio Arthur ;
orientadora Amaral Haddad Luciana -- São Paulo,
2024.

82 p. + anexo

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia
Genética).

1. TSC1. 2. TSC2. 3. MTOR. 4. UNK. I. Amaral
Haddad, Luciana, orient. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Luciana Amaral Haddad

Profa. Dra. Luciana Amaral Haddad

Orientadora

Aos meus pais Francisco Barbosa e Rita de
Cássia,
às minhas irmãs Joyce e Jackelyne,
e a todos meus amigos.

Colaborações e financiamento

O presente trabalho recebeu colaboração do Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo) e dos integrantes de seu grupo de pesquisa de Reparo do DNA, Dr. Davi Mendes e Dra. Giovana da Silva Leandro, apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo SP; Processos 2013/08028-1, 2019/10868-4 e 2022/07948-9).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Dra. Luciana Amaral Haddad pelos ensinamentos, inspiração, apoio e parceria durante minha Iniciação Científica e o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Dr. Davi Mendes, Dra. Giovana da Silva Leandro e Dra. Veridiana Munford do Laboratório de Reparo do DNA pelo uso de equipamento, instrução e contribuição na produção das células geneticamente modificadas por partículas lentivirais.

Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, Dr. Fernando Gomes, Dr. Carlos Tairum Jr. e colegas do Laboratório Proteínas e Biologia Redox pelas contribuições e uso de espaço e equipamentos.

À Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari e Profa. Dra. Andréa Laurato Sertié pelas excelentes contribuições nas discussões do projeto e resultados no comitê de acompanhamento.

Aos colegas integrantes do Laboratório de Genômica Funcional: Lígia, Inaê, Daniel, Bárbara, Luara e especialmente à Natália pela parceria e ajuda durante os longos experimentos.

Aos técnicos Andressa Sakugawa, Dra. Silvia Costa, Israel Rubio e Mara Lisboa pelos reagentes e instruções no uso de salas e equipamentos do instituto.

Aos colegas do departamento: Alan, Alexandre, Daniel, Felipe, Gabriel, Giovanna, Gustavo, Igor, Laura, Raquel, Rayssa, Sara e tantos outros fora do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva pela amizade, encorajamento e suporte.

Agradecimento especial ao técnico e amigo, sem o qual este trabalho não seria possível, MSc. Thiago Alegria pelo companheirismo, risadas e todos os ensinamentos dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais que sempre me deram todo apoio e suporte além do necessário.

Lista de figuras

Figura 1 = Ilustração simplificada da via de mTORC1 em mamíferos.	19
Figura 2 = Mecanismos canônicos de ação de mTORC1 no controle da tradução.	23
Figura 3 = Elementos em <i>cis</i> com potencial para ligação à proteína UNK preditos.	26
Figura 4 = A proteína UNK.	28
Figura 5 = Esquema dos plasmídeos usados no projeto.	36
Figura 6 = Ilustração do experimento de carenciamento seguido de tratamento com rapamicina para extração proteica.	40
Figura 7 = Ilustração do experimento de carenciamento seguido de tratamento com titulação de rapamicina para ensaio de viabilidade celular.	40
Figura 8 = Ilustração da metodologia para o estabelecimento de células HEK293T expressando shRNA anti-UNK estavelmente.	42
Figura 9 = Ilustração das três abordagens utilizadas neste projeto.	44
Figura 10 = Quantidade de transcritos em <i>Transcripts Per Kilobase Million</i> (TPM) dos genes indicados em células HEK293T tratadas com rapamicina.	45
Figura 11 = Quantidade de transcritos, em <i>Reads Per Kilobase Million</i> (RPKM), que se alinham à CDS de referência dos genes indicados.	46
Figura 12 = Quantidade de transcritos em <i>Reads Per Kilobase Million</i> (RPKM) que se alinham à CDS de referência dos genes indicados em células SH-SY5Y <i>knockdown</i> de UNK.	47
Figura 13 = Validação da expressão das proteínas relevantes ao projeto em HEK293T.	48
Figura 14 = Tratamento de HEK293T com rapamicina	50
Figura 15 = <i>Immunoblotting</i> de HEK293T após carenciamento e inibição de mTORC1 com rapamicina	52
Figura 16 = Microscopia de fluorescência de células HEK293T.	54
Figura 17 = <i>Immunoblotting</i> de HEK293T transduzidas com plasmídeos expressando shRNA controle (sh-, <i>scrambled</i>) ou shRNA anti-UNK (shA, shB ou shC).	55

Lista de tabelas

Tabela 1 = Critérios para o diagnóstico clínico de TSC	14
Tabela 2 = MicroRNAs (MIR) demonstrados experimentalmente por reduzir o RNAm de <i>TSC1</i>	17
Tabela 3 = Números de projetos do NCBI consultados por BLAST.	33
Tabela 4 = Identificação dos transcritos cujas sequências codificadoras foram utilizadas como iscas no BLAST.	33
Tabela 5 = Sequências de oligodesoxirribonucleotídeos utilizados em reação em cadeia da polimerase (PCR).	34
Tabela 6 = Anticorpos utilizados em <i>Western blots</i> .	34

Lista de acrônimos

5' TOP = motivos de oligopirimidina terminal em 5'

EMA = *European Medicines Agency*

E10.5 = estágio de desenvolvimento embrionário no dia 10.5 após fecundação

E14.5 = estágio de desenvolvimento embrionário no dia 14.5 após fecundação

E15 = estágio de desenvolvimento embrionário no dia 15 após fecundação

E16.5 = estágio de desenvolvimento embrionário no dia 16.5 após fecundação

FDA = *Food and Drug Agency*

iCLIP = *individual nucleotide resolution UV cross-linking and immunoprecipitation*

miRNA = micro RNA

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

RBP = *RNA-binding protein*

RPKM = *Reads per Kilobase per Million*

RNAi = RNA de interferência

SEGA = astrocitomas subependimários de células gigantes

shRNA = *short-hairpin RNA*

SRA = *Sequence Read Archive*

TSC = esclerose tuberosa ou complexo inibidor de mTORC1 composto por TSC1, TSC2 e TBC1D7

TPM = *Transcripts Per Kilobase per Million*

UTR = região não traduzida do RNAm do inglês *untranslated region*

ZnF = *Zinc-Finger Domain*

Sumário

Abstract	11
Resumo	12
Introdução	13
Objetivos	32
Materiais e métodos	33
Resultados	44
Discussão	57
Conclusões	64
Referências bibliográficas	65
Anexos	79

Abstract

Introduction: Tuberous sclerosis complex (TSC) is a multisystemic disease characterized by benign tumors in various organs and caused by pathogenic variants in the tumor suppressor genes *TSC1* or *TSC2*. The TSC1 and TSC2 proteins inhibit the mTORC1 pathway, which is central to the control of cell growth and proliferation. mTORC1 activity has been linked to the differential expression of specific genes. However, it is unknown whether the pathway's activity has any effect on the mRNA and protein levels expressed by the TSC complex (TSC1, TSC2, and TBC1D7). The unkempt protein (UNK), encoded by the *UNK* gene, is an RNA-binding protein that regulates mRNA expression in neuronal differentiation processes, serving as a constituent of mTORC1. Previous results from our lab identified co-expression of *TSC1* and *UNK* mRNA in tumors without pathogenic alterations in *TSC1* and *TSC2*. There is limited information on the regulation of *TSC1* and *TSC2* gene expression in modulating mTORC1 pathway activity. Moreover, it is unclear whether UNK regulates mRNA expression of certain genes in this pathway. **Aims:** The specific aims of this study were to assess (i) the effect(s) of the mTOR pathway on the RNA and protein levels expressed by *TSC1*, *TSC2*, *TBC1D7*, and *UNK* genes; and (ii) whether shRNA-mediated silencing of *UNK* alters the protein levels of TSC1 and TSC2 in HEK293T cells. **Methods:** Differential gene expression analyses were performed on publicly available transcriptome data obtained from HEK293T cells treated with rapamycin, SH-SY5Y cell line submitted to *UNK* knocking-down, or soleus muscle from mice that had been treated with rapamycin or caloric restriction for 15 months. In the laboratory, HEK293T cells were treated with rapamycin for 24 hours. A cell line was established by transduction of lentiviral particles modified to express short-hairpin RNA (shRNA) targeting *UNK*. Western blotting was conducted for quantitative comparison of target proteins. **Results:** HEK293T cells subjected to mTORC1 pathway repression by rapamycin treatment for 72 hours had an increase in *TSC2* mRNA levels. Transcriptome analysis of soleus muscle from mice treated in vivo with rapamycin for 15 months revealed an increase in *Tsc2* mRNA and a reduction in *Tsc1* and *Tbc1d7* mRNA. *UNK* knock-down in human SH-SY5Y cells resulted in a reduction in *TSC2* mRNA. Analysis of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex proteins in unmodified HEK293T cells showed an increase in UNK levels 24 hours after starvation, which was maintained during consecutive rapamycin treatment for an additional 24 hours. A HEK293T cell line with significant reduction of UNK protein was generated, and no change was observed in the levels of any of the three TSC1-TSC2-TBC1D7 complex proteins. **Conclusions:** Our data indicate that the mTORC1 pathway has a negative effect on *TSC2* mRNA levels in HEK293T cells and mouse soleus muscle. In HEK293T cells, mTORC1 pathway inactivity increases UNK protein levels. Reduction of UNK protein in this cell line does not alter the levels of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex proteins. In SH-SY5Y cell line, UNK reduction decreases *TSC2* mRNA levels, supporting the negative effect of mTORC1 observed on this mRNA. **Limitations:** This study has the limitation of not having submitted the genetically modified cell line (shRNA for UNK) to specific mRNA quantification assessment or pharmacological repression of the mTORC1 pathway. Therefore, the cell line established in this research project will be valuable for testing the model of mTORC1 regulation of the *TSC2* mRNA levels and its dependence on UNK.

Keywords: TSC1, TSC2, mTOR, UNK.

Resumo

Introdução: O complexo da esclerose tuberosa (TSC, do inglês, *tuberous sclerosis complex*) é uma doença sistêmica, caracterizada por tumores benignos em diferentes órgãos e causada por variantes patogênicas nos genes supressores de tumores *TSC1* ou *TSC2*. As proteínas TSC1 e TSC2 inibem a via de mTORC1, central no controle do crescimento e proliferação celular. A atividade de mTORC1 tem sido relacionada à expressão diferencial de determinados genes. Contudo, não é conhecido se a atividade da via tem algum efeito sobre a quantidade de RNAm e proteína expressos pelos genes do complexo TSC (TSC1, TSC2 e TBC1D7). A proteína *unkempt* (UNK), codificada pelo gene *UNK*, é ligante de RNA e regula a expressão de RNAm, em processos de diferenciação neuronal, como parte constituinte de mTORC1. Resultados anteriores do nosso laboratório identificaram a co-expressão do RNAm de *TSC1* e *UNK* em tumores sem alterações patogênicas em *TSC1* e *TSC2*. Pouco se conhece sobre a regulação da expressão dos genes *TSC1* e *TSC2* na modulação da atividade da via de mTORC1, tampouco se UNK regula a expressão de RNAm de genes dessa via. **Objetivos:** Os objetivos deste trabalho foram avaliar: (i) o(s) efeito(s) da via de mTOR sobre a quantidade de RNAm e proteínas expressos pelos genes *TSC1*, *TSC2*, *TBC1D7* e *UNK*; e (ii) se o silenciamento de *UNK* por shRNA altera a quantidade das proteínas TSC1 e TSC2 em HEK293T. **Métodos:** Análises de expressão gênica diferencial foram realizadas em dados de transcriptomas, publicamente disponíveis, obtidos de linhagens celulares HEK293T tratada com rapamicina, SH-SY5Y com *knocking down* de *UNK* ou de músculo sóleo de camundongos que haviam sido tratados com rapamicina ou restrição calórica por 15 meses. No laboratório, HEK293T foi tratada com rapamicina por 24 horas. Foi estabelecida uma linhagem celular por transdução de partículas lentivirais modificadas para expressão de shRNA (*short-hairpin* RNA) para silenciamento de *UNK*. Análise proteica em *blot* foi realizada para comparação quantitativa das proteínas-alvo. **Resultados:** HEK293T submetida à repressão da via de mTORC1 por rapamicina apresentou, após 72 horas, aumento da quantidade de RNAm de *TSC2*. Os dados de transcriptoma de músculo sóleo de camundongos tratados *in vivo* por 15 meses com rapamicina revelaram aumento da quantidade de RNAm de *Tsc2* e redução do RNAm de *Tsc1* e *Tbc1d7*. Na linhagem humana SH-SY5Y que sofreu *knocking down* de UNK houve redução do RNAm de *TSC2*. O estudo das proteínas do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 em linhagem HEK293T não modificada mostrou aumento do nível de UNK 24 horas após carenciamento, que foi mantido durante tratamento consecutivo com rapamicina por mais 24 horas. Foi gerada uma linhagem de HEK293T em que a proteína UNK foi significativamente reduzida. Nela, não se observou alteração da quantidade de nenhuma das três proteínas do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7. **Conclusões:** Nossos dados indicam que a via de mTORC1 tem efeito negativo sobre a quantidade de RNAm de *TSC2* em HEK293T e músculo sóleo de camundongo. Em HEK293T, a inatividade da via de mTORC1 aumenta o nível da proteína UNK. A redução da proteína UNK nessa linhagem celular não altera a quantidade das proteínas do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7. Em linhagem celular SH-SY5Y, a redução de UNK diminui a quantidade de RNAm de *TSC2*, corroborando o efeito negativo de mTORC1 observado sobre esse RNAm. **Limitações:** O estudo tem as limitações de não ter testado alterações da quantidade de RNAm nem ter avaliado o efeito da inibição da via de mTORC1 na linhagem celular geneticamente modificada (shRNA para *UNK*). Logo, a linhagem celular estabelecida neste projeto de pesquisa será valiosa para se testar o modelo em que a atividade de mTORC1 reduz a quantidade do RNAm de *TSC2* e se essa regulação depende de UNK.

Palavras-chave: TSC1, TSC2, mTOR, UNK.

1. Introdução

1.1. O complexo da esclerose tuberosa

O complexo da esclerose tuberosa (TSC, do inglês, *tuberous sclerosis complex*) é uma doença genética com herança autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de tumores benignos em diversos órgãos, afetando com maior frequência órgãos como a pele, sistema nervoso central, pulmões e rins, sendo considerada uma doença sistêmica (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2021; Portocarrero *et al.*, 2018; Rosset *et al.*, 2017). A maioria dos tumores associados ao TSC são hamartomas e, no córtex cerebral, observa-se hamartia que diferem de hamartomas por não apresentarem aumento da proliferação celular (Huttenlocher e Wollmann, 1991). De forma associada à hamartia, a doença manifesta-se comumente com epilepsia refratária que se relaciona a deficiência intelectual e transtorno do espectro autista. A incidência da doença é de 1:6000 a 1:10.000 nascimentos e, atualmente, estima-se que cerca de 2 milhões de pessoas vivam com TSC (Henske *et al.*, 2016). O diagnóstico pode ocorrer a partir do período pré-natal, embora o quadro clínico seja variável, podendo se manifestar em diferentes fases do desenvolvimento (Northrup *et al.*, 2021, Northrup e Krueger., 2013; Portocarrero *et al.*, 2018). A doença é causada pela inativação bialélica provocada por variantes patogênicas nos genes supressores de tumor *TSC1* e *TSC2*, a penetrância pode chegar a 95% e a expressividade pode variar mesmo dentro de uma única família (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 1993).

As primeiras observações clínicas de TSC foram inicialmente descritas por Friedrich Daniel von Recklinghausen há cerca de 160 anos, após encontrar rabdomiomas e lesões cerebrais em um natimorto (Gómez, 1995; Northrup e Krueger, 2013 *apud* von Recklinghausen, 1862). Pouco tempo depois, em 1880, Désiré-Magloire Bourneville fez a primeira caracterização das lesões comumente encontradas no cérebro dos afetados como tuberosidades corticais, que inspiraram o nome da doença dada sua consistência mais firme (esclerose) e morfologia semelhante a tubérculos (Gómez, 1995 *apud* Bourneville 1880; Henske *et al.*, 2016). A partir da clonagem dos genes *TSC1* e *TSC2*, em 1993 e 1997, respectivamente, foi demonstrado que a inativação bialélica de um ou outro é responsável pelo desenvolvimento de hamartomas do TSC. O estudo dos genes e produtos de sua expressão aumentou a compreensão sobre a doença e levou à aprovação de fármacos indicados para o controle do tamanho tumoral. Comitês internacionais de acompanhamento e

atualizações reveem periodicamente as recomendações de diagnóstico e tratamento de acordo com o avanço das pesquisas (Northrup *et al.*, 2013; Northrup *et al.*, 2021).

O diagnóstico definitivo de TSC se dá pela combinação de lesões identificadas no paciente e/ou detecção de variante patogênica nos genes *TSC1* e *TSC2* que sabidamente inativa a produção da respectiva proteína (Northrup *et al.*, 2021). O diagnóstico clínico definitivo de TSC ocorre quando o paciente apresenta pelo menos dois critérios principais ou um critério principal e dois ou mais critérios secundários (Tabela 1; Northrup *et al.*, 2021). Na presença de somente um critério principal ou dois critérios secundários, é considerado diagnóstico provável (inconclusivo) de TSC, ao qual está indicado o seguimento clínico.

Tabela 1. Critérios para o diagnóstico clínico de TSC. Adaptado de Northrup *et al.*, 2021.

Critérios principais	Critérios secundários
Máculas hipomelanóticas (≥ 3 ; pelo menos 5 mm de diâmetro)	Lesões de pele em confete
Angiofibroma (≥ 3) ou placa cefálica fibrótica	Microcrateras no esmalte dentário (≥ 3)
Fibromas ungueais (≥ 2)	Fibromas intraorais (≥ 2)
Placa fibrótica do tipo shagreen	Acromia retiniana
Hamartomas retinianos múltiplos	Cistos renais múltiplos
Tuberosidades corticais múltiplas e/ou linhas de migração radiais	Hamartomas não renais
Nódulo subependimário (≥ 2)	Lesões ósseas escleróticas
Astrocitoma subependimário de células gigantes (SEGA)	
Rabdomioma cardíaco	
Linfangioleiomiomatose pulmonar*	
Angiomiolipoma (≥ 2)*	

*A combinação dos dois critérios principais angiomiolipoma e linfangioleiomiomatose pulmonar sem outros critérios não leva ao diagnóstico definitivo de TSC, pois apresentam a mesma origem patogênica.

Atualmente, a identificação de variantes patogênicas em *TSC1* ou *TSC2* é suficiente para o diagnóstico genético de TSC independentemente de manifestações clínicas. O diagnóstico genético definitivo ganhou importância clínica nos casos com diagnóstico clínico, provável de TSC, pois os sintomas da doença surgem e se agravam em diferentes idades de

acordo com o órgão afetado e o diagnóstico precoce contribui para o tratamento e acompanhamento longitudinal dos indivíduos afetados (Northrup *et al.*, 2021).

Embora o diagnóstico genético seja importante, em cerca de 10 a 15% dos casos de TSC não são encontradas variantes patogênicas nos genes *TSC1* e *TSC2* (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2021). Contudo, a não detecção de variantes patogênicas nos genes em casos confirmados de TSC é atualmente entendida como falta de cobertura e anotação de variantes intrônicas, variantes em regiões promotoras e outras regiões regulatórias da expressão dos genes e ocorrência de mosaïcismo somático (Henske *et al.*, 2016; Nellist *et al.*, 2015).

Embora TSC seja uma doença sistêmica, suas manifestações no cérebro causam especial impacto na qualidade de vida dos afetados. Displasias corticais focais (hamartias) são alterações morfológicas no cérebro comumente encontradas em casos de TSC, caracterizadas por tuberosidades corticais e heterotopias neuronais, associadas à epilepsia. As tuberosidades corticais são formadas por células com padrão anormal de migração encontradas em cerca de 90% dos casos (Northrup *et al.*, 2013). Epilepsia é o sinal mais comum da doença, estando presente em cerca de 90% dos casos (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2021). Por volta de dois terços dos pacientes apresentam epilepsia refratária (Henske *et al.*, 2016). Os episódios de epilepsia nos primeiros meses de vida, caracterizados como espasmos infantis, têm intensidades e frequências variadas e, se não controlados, estão diretamente relacionados à progressão do quadro neurológico dos pacientes (Henske *et al.*, 2016; Schubert-Bast e Strzelczyk, 2021).

Os tumores do tipo astrocitomas subependimários de células gigantes (SEGAs, do inglês *subependymal giant cell astrocytomas*) no parênquima adjacente aos ventrículos cerebrais, manifestam-se em cerca de 5 a 15% dos casos (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2013; Portocarrero *et al.*, 2018). SEGAs, se não detectados e tratados precocemente, podem causar obstrução do fluxo normal de líquido cefalorraquidiano, levando a graves complicações neurológicas e até mesmo ao óbito (Henske *et al.*, 2016).

Na última década, a busca por medicamentos para o tratamento da doença levou a estudos clínicos e aprovação de drogas por agências reguladoras, como FDA (*Food and Drug Administration*, Silver Spring MD, EUA), EMA (*European Medicines Agency*, Holanda) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília DF). Everolimo (Afinitor™, Novartis) inibe a atividade de mTOR (do inglês, *mammalian/mechanistic target of rapamycin*) e é indicado no tratamento de angiomiolipoma renal, SEGA e como terapia

adjuvante para epilepsia, associados a TSC (Henske *et al.*, 2016; Portocarrero *et al.*, 2018). Outro inibidor de mTOR, sirolimo (Rapamune®, Pfizer), é indicado para o tratamento da linfangioleiomiomatose pulmonar (Revilla-lópez *et al.*, 2021). Dentre essas, a única indicação ainda não obtida no Brasil é para everolimo como adjuvante no tratamento da epilepsia associada a TSC. De acordo com a evolução e manifestação da doença, outros tratamentos para pacientes com TSC se baseiam no controle de sinais e sintomas que repercutem no bem-estar e qualidade de vida dos pacientes.

1.2. Os genes *TSC1* e *TSC2*

O gene *TSC1* (NM_000368.5; O'Leary *et al.*, 2015), localizado em 9q34.13 (GRCh38.p14), tem 26 éxons e 53 kb. O gene *TSC2* (NM_000548.5; O'Leary *et al.*, 2015) mapeia-se em 16p13.3 (GRCh38.p14), tem 45 éxons e 41 kb. *TSC1* e *TSC2* são genes supressores tumorais e a inativação bialélica de um ou outro é necessária para o desenvolvimento dos hamartomas associados ao TSC. Tratando-se de genes supressores tumorais, a necessidade de inativação bialélica segue o modelo de dois eventos de Knudson, sendo o segundo necessariamente somático (Knudson *et al.*, 1971). Variantes patogênicas no gene *TSC1* são identificadas em cerca de 20% dos casos, enquanto variantes patogênicas no gene *TSC2* são observadas em aproximadamente 70% dos pacientes diagnosticados com TSC (Henske *et al.*, 2016; Northrup *et al.*, 2013). Variantes *nonsense* e *indels* que criam códons de parada prematura da tradução são frequentemente encontradas em *TSC1*, sendo baixo o número de variantes *missense* com efeito patogênico comprovado (Henske *et al.*, 2016). Em contrapartida, além das variantes *nonsense* e *indels* também muito comuns em *TSC2*, variantes patogênicas do tipo *missense* e rearranjos cromossômicos são frequentes em *TSC2* (Henske *et al.*, 2016; Rosset *et al.*, 2017).

1.3. Os transcritos *TSC1* e *TSC2*

A expressão gênica pode ser controlada em diversos níveis, desde a transcrição às modificações pós-traducionais da atividade e estabilidade da proteína codificada. As regiões não traduzidas do RNAm maduro (UTR, do inglês *untranslated region*) são conhecidas por conterem elementos em *cis* que, ao interagir com fatores em *trans*, podem atuar na regulação pós-transcricional da expressão gênica. O transcrito 1 do gene *TSC2* (NM_000548.5; O'Leary *et al.*, 2015) humano apresenta uma região 3' UTR com 881 bases. Em contrapartida, o

transcrito 1 de *TSCI* (NM_000368.5; O'Leary *et al.*, 2015) tem 4.886 bases em sua região 3' UTR, sugerindo que este segmento no RNAm contenha elementos reguladores de sua estabilidade e/ou tradução. Apesar desta diferença contrastante, pouco se tem investigado sobre o papel regulador que elementos em *trans* podem ter sobre a expressão de *TSCI*. Entre os elementos em *trans* capazes de regular a expressão de RNAs, destacam-se as proteínas ligantes de RNA (RBP; do inglês *RNA-binding protein*) e microRNAs (miRNAs). Esses elementos podem modular a localização, eficiência de tradução e a estabilidade dos transcritos ao interagir com diferentes complexos proteicos, contribuindo para o controle espacial e temporal da expressão gênica. De acordo, os efeitos de um pequeno número de miRNAs sobre o RNAm de *TSCI* já foram experimentalmente demonstrados em diferentes organismos (Tabela 2). Em contrapartida, o papel que RBPs podem exercer na regulação do transcrito de *TSCI* tem sido pouco investigado.

Tabela 2: MicroRNAs (MIR) demonstrados experimentalmente por reduzir o RNAm de *TSCI*.

MIR	Tipo celular	Referência bibliográfica
MIR_25, MIR_32	Linhagem humana U87*	Suh <i>et al.</i> , 2012
MIR_155	MCF-7 (linhagem hum. mamária)*	Martin <i>et al.</i> , 2014
MIR_19, MIR_19B	Rins de <i>Xenopus</i> e linhagem renal LLC-PK	Romaker <i>et al.</i> , 2014
MIR_126-3p, MIR_451A	Adenocarcinoma pulmonar humano	Chen <i>et al.</i> , 2016
MIR_451A	Linhagem celular humana AGS (adenocarcinoma humano)*	Riquelme <i>et al.</i> , 2015; Trattnig <i>et al.</i> , 2018
MIR_18, MIR_25	Carcinoma hepatocelular*	Sanchez-Mejias <i>et al.</i> , 2018
MIR_130A	Linhagens humanas de carcinoma oral de célula escamosa	Malella <i>et al.</i> , 2021
MIR_130-3p	Linhagem humana U87*	Xu <i>et al.</i> , 2022

*Redução protéica também.

MIR sublinhados: identificados mais de uma vez.

Terapias gênicas para expressão do gene que se encontra inativo, *TSC1* ou *TSC2*, têm sido exploradas em estudos pré-clínicos com camundongos modelos para TSC (Cheah *et al.*, 2021; Prabhakar *et al.*, 2015; Prabhakar *et al.*, 2019). Contudo, uma vez que os elementos em *cis* e em *trans* que regulam os transcritos de *TSC1* ou *TSC2* são pouco conhecidos, não é claro se a expressão *in vivo* do transgene contendo somente a região codificadora seria suficiente para recuperar completamente a expressão, estabilidade e função do dímero TSC1-TSC2, ou se a inclusão de algum elemento regulatório no transgene controlaria sua expressão de forma mais eficiente.

1.4. As proteínas TSC1 e TSC2

O gene *TSC1* codifica para a proteína hamartina que tem 1.164 aminoácidos e massa molecular de 129,7 kDa (Q92574-1, The Uniprot Consortium, 2018). *TSC2* codifica para a proteína tuberina, com 1.807 aminoácidos e 200,6 kDa (P49815-1, The Uniprot Consortium, 2018). Uma vez sintetizadas, as proteínas interagem através de seus domínios *coiled-coils* (van Slegtenhorst *et al.*, 1998; Nellist *et al.*, 1999), formando um complexo que inibe o alvo da rapamicina, mTOR em seu complexo 1 (mTORC1; Fig. 1). A via de mTORC1 integra diferentes efetores e vias, sua atividade é responsável pelo controle global da síntese proteica e inibição da autofagia, promovendo o crescimento e proliferação celular (Laplanche e Sabatini, 2009; Lipton e Sahin, 2014; Liu e Sabatini, 2020).

No complexo inibidor de mTORC1, TSC1 atua como uma co-chaperona que estabiliza TSC2 impedindo sua ubiquitinação e degradação (Benvenuto *et al.*, 2000; Nellist *et al.*, 1999). Em sua porção C-terminal, TSC2 contém um domínio GAP (do inglês, *GTPase-activating Protein*) responsável pela promoção da hidrólise do GTP associado a RHEB (do inglês *Ras homolog, mTORC1 binding*). A hidrólise do GTP a GDP inativa RHEB, tendo como consequência a inibição de mTORC1 (Düvel *et al.*, 2010; Liu e Sabatini, 2020). Embora TSC1 não participe ativamente da reação, sua ligação a TSC2 aumenta significativamente a função GTPásica de TSC2 sobre RHEB (Düvel *et al.*, 2010).

A atividade do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 é modulada por diferentes fatores e vias. A fosforilação de TSC2 pela cinase AKT1 (do inglês, *AKT serine/threonine kinase 1*) ocorre em resposta a quantidade de nutrientes e fatores de crescimento, a jusante do receptor de insulina (Huang e Manning, 2008; Laplanche e Sabatini, 2009). A cinase AMPK (do inglês,

AMP-activated protein kinase) é um importante fator na modulação da homeostase celular e é ativada em resposta à ausência de nutrientes, hipóxia e estresse genotóxico (Kim *et al.*, 2016). Na diminuição da quantidade de energia disponível (i.e. diminuição da razão ATP:ADP), TSC2 é fosforilado por AMPK, causando um aumento em sua atividade (Inoki *et al.*, 2003). Uma variedade de cinases e vias pode afetar direta e indiretamente a atividade de TSC1 e TSC2 (para um panorama aprofundado destes cenário de regulação, se dirigir às excelentes revisões: Huang e Manning, 2008; Lipton e Sahin, 2014; Liu e Laplante, 2009; Liu e Sabatini, 2020).

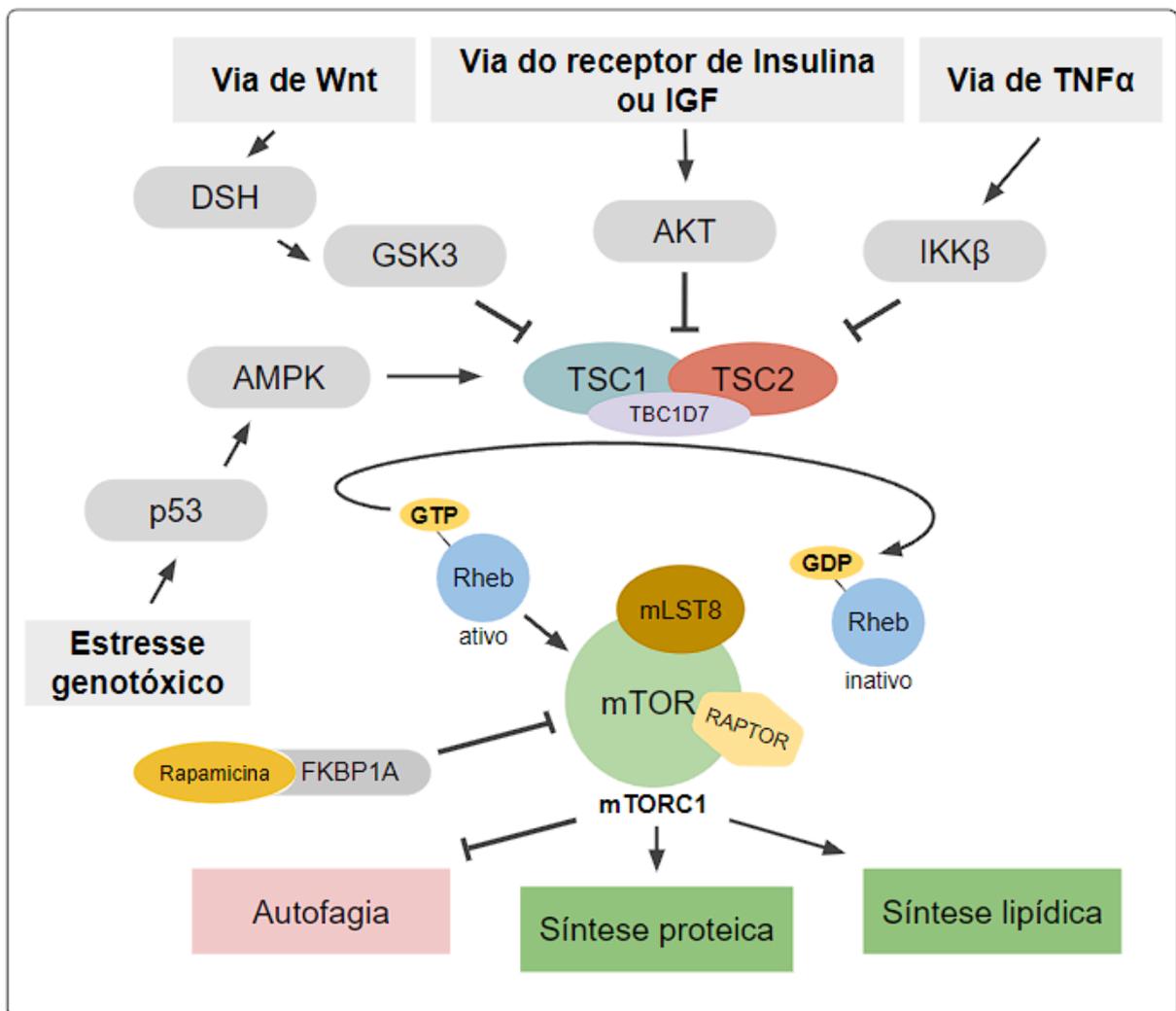


Figura 1. Ilustração simplificada da via de mTORC1 em mamíferos. mTORC1 é uma via central no controle do crescimento e proliferação celular, integrando sinalizações de vias importantes nestes processos. O complexo TSC (formado por TSC1, TSC2 e TBC1D7) inibe indiretamente a atividade da via ao hidrolisar o GTP associado à Rheb, tornando-o inativo.

1.5. TBC1D7: a terceira integrante do complexo TSC1-TSC2

Na última década, foi descoberto um terceiro integrante do complexo inibidor de mTORC1: a proteína TBC1D7 (Dibble *et al.*, 2012). A proteína TBC1D7 tem 33,9 kDa (Q9P0N9-1, The Uniprot Consortium, 2018) e é codificada pelo gene homônimo (NM_016495.6; O'Leary *et al.*, 2015), localizado em 6p24.1 (GRCh38.p14), composto por oito éxons e 23 kb. TSC1 se liga à TBC1D7 através de seu longo domínio *coiled-coils*, contribuindo para a estabilidade do complexo (Dibble *et al.*, 2012; Gai *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021). Experimentos recentes usando técnicas de criomicroscopia eletrônica de transmissão determinaram que o complexo, agora mais adequadamente referido como TSC ou TSC1-TSC2-TBC1D7, existe *in vivo* na razão estequiométrica de 2:2:1 (TSC1:TSC2:TBC1D7) (Yang *et al.*, 2021). Embora importante para a estabilidade do complexo, até o momento não existem indícios de que variantes de perda de função de *TBC1D7* causem TSC. No entanto, variantes de perda de função de *TBC1D7*, em homozigose, associadas ao aumento da atividade de mTORC1, foram encontradas em famílias com casos de megaencefalia e deficiência intelectual (Alfaiz *et al.*, 2014; Capo-Chichi *et al.*, 2013). Além de TBC1D7, as proteínas chaperonas evolutivamente conservadas HSP70 e HSP90 também interagem com TSC1 e podem atuar no correto dobramento e estabilidade do complexo TSC (Natarajan *et al.*, 2020; Lynham e Houry, 2022).

1.6. A via de mTORC1

Na década de 1970, estudos de prospecção de solo nas ilhas de Rapa Nui (Páscoa, Chile), levaram ao isolamento de um macrolídeo de *Streptomyces hygroscopicus* com propriedades antibióticas, ao qual se deu o nome rapamicina (Vézina *et al.*, 1975). A molécula recém-descoberta mostrou ter ação antifúngica, impedindo a proliferação de diferentes linhagens *in vitro*, ao passo que não afetava procariotos (Vézina *et al.*, 1975). Posteriormente, o mecanismo molecular de ação começou a ser desvendado quando o complexo rapamicina-FKBP1A (do inglês, *FKBP prolyl isomerase 1A*; também conhecida como FKBP12) foi isolado em estudos de purificação por afinidade (Bierer *et al.*, 1990; Chung *et al.*, 1992). Já neste primeiro momento foi descoberto que a administração de rapamicina causava diminuição na fosforilação de S6K1 (do inglês, *ribosomal protein S6 kinase*; também conhecida como *RPS6KB1*) e S6 (do inglês, *ribosomal protein S6*; também conhecida como RPS6) em diferentes linhagens de mamíferos. No entanto, o mecanismo completo, assim

como a identificação da via afetada, só foi elucidado em 1994 quando diferentes grupos demonstraram que o complexo rapamicina-FKBP1A interagia com a cinase mTOR que, por sua vez, era a responsável pela fosforilação de S6K1 e outros alvos na via de mTORC1 (Sabatini *et al.*, 1994; Sabers *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1994).

A rapamicina é um inibidor alostérico específico de mTOR (Artoni *et al.*, 2023; Benjamin *et al.*, 2011). A molécula liga-se a FKBP1A e o complexo formado interage com mTOR em mTORC1, causando a diminuição da atividade da proteína ao dificultar o acesso dos substratos ao sítio catalítico (Yang *et al.*, 2013). Além da rapamicina (comercialmente conhecida como sirolimo), análogos da rapamicina (*rapalogs*), como temsirolimo, everolimo e ridaforolimo, desempenham papel semelhante na via de mTORC1 e têm sido usados para fins terapêuticos com eficiências e frequências variadas no tratamento de tumores, epilepsia, como imunossuppressores em transplantes, entre outras finalidades (Liu e Sabatini, 2020; Schubert-Bast e Strzelczyk, 2021; Zaytseva *et al.*, 2012). Além de *rapalogs*, inibidores cujos mecanismos não se relacionam a FKBP1A têm sido desenvolvidos. Essas moléculas, chamadas de inibidores de segunda geração, competem com o ATP pelo sítio catalítico de mTOR, impedindo a fosforilação de seus alvos e atingindo tanto mTORC1 quanto mTORC2 (Benjamin *et al.*, 2011; Zaytseva *et al.*, 2012).

O gene *MTOR* está localizado em 1p36.22 (GRCh38.p14), tem 60 éxons, 156 kb e codifica para a proteína de mesmo nome de 2.549 aminoácidos e massa molecular de 288 kDa (P42345, The Uniprot Consortium, 2018). A proteína codificada pelo gene é componente de nódulos efetores centrais em duas vias de sinalização intracelular diferentes: os complexos 1 e 2 de mTOR, respectivamente mTORC1 e mTORC2, ambas envolvidas em processos importantes no controle do ciclo e da proliferação celular (Laplante e Sabatini, 2009; Lipton e Sahin, 2014; Liu e Sabatini, 2020). mTORC1 é uma importante cascata de sinalização celular que regula o crescimento, proliferação e sobrevivência celular em resposta a diversos estímulos, como nutrientes, energia e fatores de crescimento. A via desempenha papel crucial na homeostase celular e a desregulação dela está implicada em diversas doenças, incluindo câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas, além de ter impacto importante no controle do envelhecimento (Liu e Sabatini, 2020).

mTOR é uma cinase de serinas e treoninas pertencente à família de cinases relacionadas à PI3K (PIKK) responsável pela fosforilação de proteínas essenciais no controle da tradução (Fig. 2; Liu e Sabatini, 2020). Na via de mTORC1, mTOR interage com mLST8 (do inglês, *MTOR associated protein*, *LST8 homolog*) e RAPTOR, sendo este último

responsável pelo recrutamento de proteínas que contêm o domínio de sinalização TOR, presente em diversos alvos de fosforilação canônicos de mTORC1 (Liu e Sabatini, 2020). Quando ativa, mTORC1 fosforila S6K1 aumentando a atividade da enzima. S6K1 tem como substrato a proteína ribossomal S6 que, quando fosforilada, favorece a formação do ribossomo 80S e a tradução global de RNAs. Outra maneira pela qual mTORC1 controla a tradução global ocorre através da fosforilação da proteína 4EBP1 (do inglês, *eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1*, também conhecido como EIF4EBP1). Quando fosforilada, 4EBP1 não consegue se ligar e sequestrar eIF4E, permitindo a interação de eIF4E livre com eIF4G e com o 5' *cap* de RNAs. A interação de eIF4E com eIF4G e 5' *cap* promove a formação do complexo eIF4F e, como consequência, o início da tradução dependente de 5' *cap*.

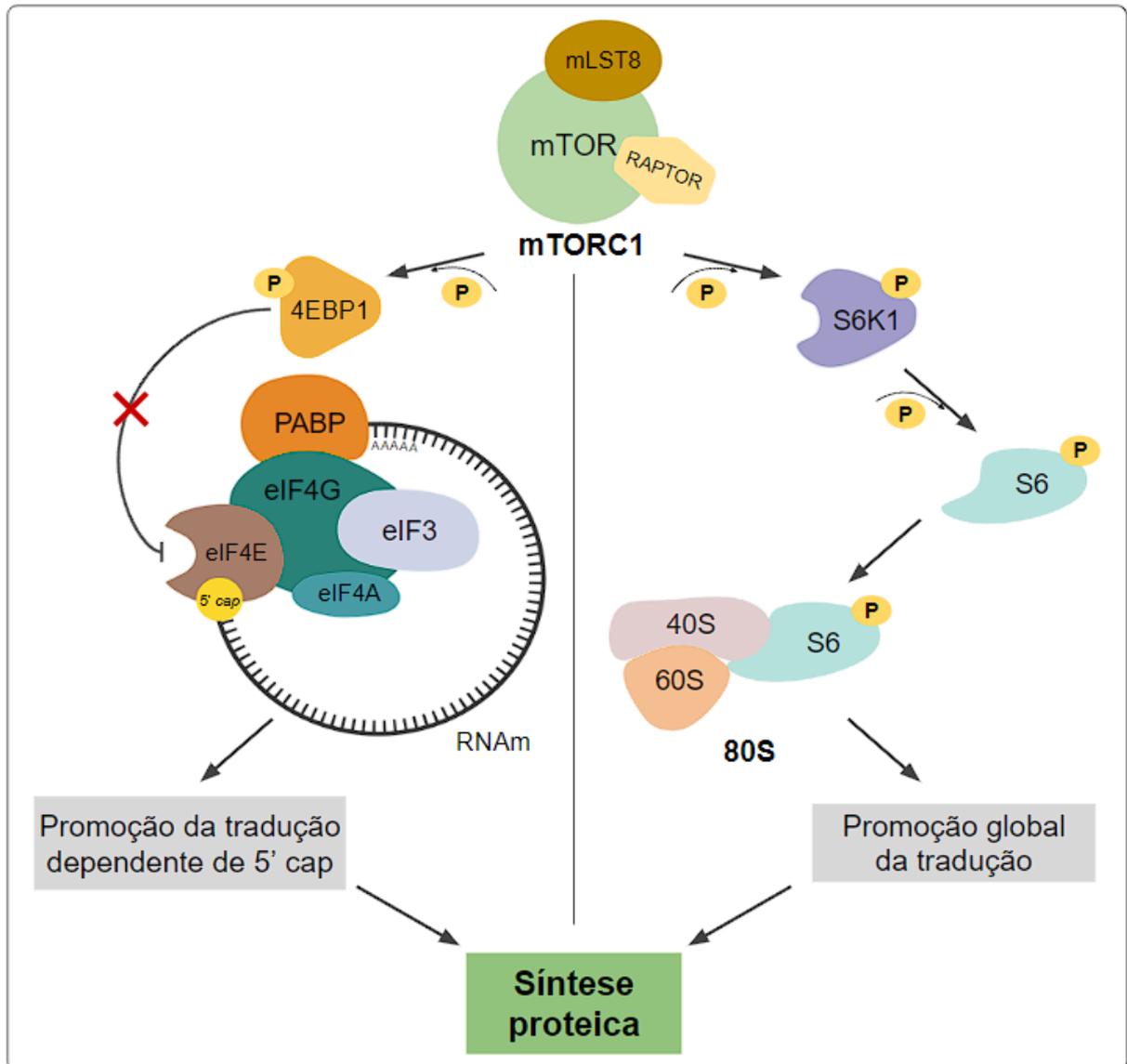


Figura 2. Mecanismos canônicos de ação de mTORC1 no controle da tradução. A fosforilação de 4EBP1 inibe a interação de 4EBP1 com eIF4E, permitindo sua ligação à eIF4G e ao 5' cap de RNAs, favorecendo a formação do complexo eIF4F e o início da tradução dependente de 5' cap (esquerda). A fosforilação de S6K1 ativa a proteína, promovendo a fosforilação de S6 e a formação do ribossomo 80s (direita). Ambas as situações promovem a tradução global de RNAs, levando ao aumento da síntese proteica.

Embora mTOR seja tradicionalmente considerada uma proteína citoplasmática, frequentemente associada à membrana lisossomal, o número de evidências da presença de mTOR no núcleo celular tem crescido nos últimos anos (Bachmann *et al.*, 2006; Chaveroux *et al.*, 2013; Kim e Chen, 2000; Li *et al.*, 2006; Tsang *et al.*, 2010). Isso, associado ao fato do aumento da expressão de RNAm de alguns genes após perturbações da via, tem levado pesquisadores a considerar uma possível interferência direta da proteína em processos de

transcrição, o que tem sido demonstrado em alguns trabalhos (Chaveroux *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2006; Thoreen *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2010).

1.7. mTORC1 e expressão gênica

O papel da via de mTORC1 na modulação dos processos de transcrição tem sido investigado nos últimos anos. Tanto mTORC1 quanto mTORC2 podem modular a transcrição de determinados genes de maneira indireta ao promover a fosforilação de fatores de transcrição (Düvel *et al.*, 2010; Michels *et al.*, 2010; Liu e Sabatini, 2020). A atividade de mTOR na via de mTORC1 é responsável pela fosforilação de HIF1 α (do inglês, *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*), aumentando a expressão de enzimas da via glicolítica e favorecendo a glicólise (Düvel *et al.*, 2010). Os fatores de transcrição SREBF1 e SREBF2 (do inglês, *sterol regulatory element binding transcription factor 1 and 2*) são fosforilados por S6K1, cuja atividade é modulada pela via de mTORC1. A fosforilação de SREBF1 e SREBF2 leva à ativação desses fatores de transcrição e a indução da expressão de genes relacionados à biossíntese de lipídios, via das pentoses-fosfato e proliferação celular (Düvel *et al.*, 2010).

O fator de transcrição MAF1 (do inglês, *MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III*) é fosforilado por mTOR em mTORC1 (Michels *et al.*, 2010). A fosforilação de MAF1 impede sua ligação à RNA polimerase III (pol III), permitindo que a enzima transcreva genes para RNA transportador (RNAt), precursor da subunidade ribossomal 5 (5S), RNA do componente U6 do spliceossomo, além de uma variedade de RNAs curtos essenciais para a homeostase celular (Kulaberoglu *et al.*, 2021; Michels *et al.*, 2010).

mTORC1 regula a localização nuclear e atividade do fator de transcrição TFEB (do inglês, *transcription factor EB*). Sob condições fisiológicas de nutrientes e energia, TFEB é fosforilado de forma dependente de mTORC1, causando sua retenção citosólica. Inibição da via de mTORC1 permite rápida translocação de TFEB ao núcleo celular que então ativa a expressão de genes que codificam para proteínas com funções no lisossomo e autofagia (Peña-Lopis *et al.*, 2011; Settembre *et al.*, 2011; Martina *et al.*, 2012; Roczniak-Ferguson *et al.*, 2012).

Além de a atividade de mTORC1 controlar globalmente o início da tradução, ela pode regular especificamente um conjunto de transcritos com motivos de oligopirimidina terminal em 5' (5' TOP) (Cockman *et al.*, 2020; Philippe *et al.*, 2017; Thoreen *et al.*, 2012). O motivo 5' TOP é uma sequência conservada na extremidade 5' de certos RNAm, especialmente

aqueles que codificam para proteínas ribossômicas e fatores de tradução (Cockman *et al.*, 2020). Esses RNAm são frequentemente chamados RNAm 5' TOP. Quando ativo, mTORC1 fosforila 4EBP1, impedindo a ligação de 4EBP1 a eIF4E. EIF4E passa a interagir mais favoravelmente com eIF4G, promovendo o aumento global da tradução e causando impacto mais significativo na tradução de 5' TOP RNAs (Thoreen *et al.*, 2012). LARP1 (do inglês, *La ribonucleoprotein 1, translational regulator*) é indispensável neste processo, uma vez que essa proteína se liga diretamente ao motivo 5' TOP do RNA e à estrutura do cap em 5', inibindo a tradução. A ligação de LARP1 a RNAm 5' TOP é exacerbada quando há carência de aminoácidos. Neste contexto, LARP1 se associa a polimerases de poli-A não canônicas que estendem a cauda de poli-A dos RNAm 5' TOP, aumentando sua estabilidade em períodos de carência nutricional. Com a reposição de aminoácidos, a atividade de mTOR fosforila LARP1 que então deixa de reprimir o RNAm 5' TOP, que passa a ter um decaimento do comprimento da cauda de poli-A (Ogami *et al.*, 2022; Baptissart *et al.*, 2023).

1.8. Estudos de co-expressão em dados de transcriptoma tumoral

No laboratório de Genômica Funcional do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), temos interesse em entender a relevância funcional da longa região 3' não traduzida no RNAm de *TSCI* humano, de forma relativamente conservada (77% de identidade) no ortólogo murino (Anexo 1).

Em trabalho anterior, em busca por transcritos que sejam superexpressos junto ao de *TSCI*, realizamos análises *in silico* de co-expressão. Partimos da premissa que esses transcritos poderiam ser co-regulados. Nosso ponto de partida foi um conjunto de dados de RNA-Seq de 9.144 tumores do banco de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, Cambridgeshire, Reino Unido) e a variável principal foi o valor de *z-score* da distribuição de *reads per kilobase per million* (RPKM). Nenhum tumor tinha alteração patogênica em *TSCI* ou *TSC2*. Em amostras onde *TSCI* estava superexpresso (N = 177; > 2 desvios-padrão), observaram-se demais genes cujos RNAs também estavam superexpressos. Análise de ontologia genética classificou os genes co-superexpressos com *TSCI* em três classes de acordo com suas funções moleculares, sendo uma delas a classe RBP. Dentre os genes que codificam para RBPs co-superexpressos com *TSCI*, detectamos *UNK* (45/177; 25,4%; $\chi^2 = 37,8$; $gl = 1$; $p = 1 \times 10^{-9}$) com frequência mais elevada do que a esperada.

O gene *UNK* mapeia-se em 17q25.1, tem 20 éxons e 41 kb. Codifica para a proteína UNKEMPT, que tem sido implicada na via de mTORC1, à jusante de mTOR (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Baskaran *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2019; Maierbrugger *et al.*, 2020). UNK é importante em processos de diferenciação de células neuronais e sua expressão tem sido validada em diferentes tecidos e organismos (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Maierbrugger *et al.*, 2020; Murn *et al.*, 2015a; Vinsland *et al.*, 2021). Análises *in silico* da região 3' UTR de *TSC1* e da sequência codificadora do transcrito de *TSC2* revelaram elementos em *cis* conservados em camundongo com sequência consenso para UNK e, portanto, potencial para sua ligação (Fig. 3).

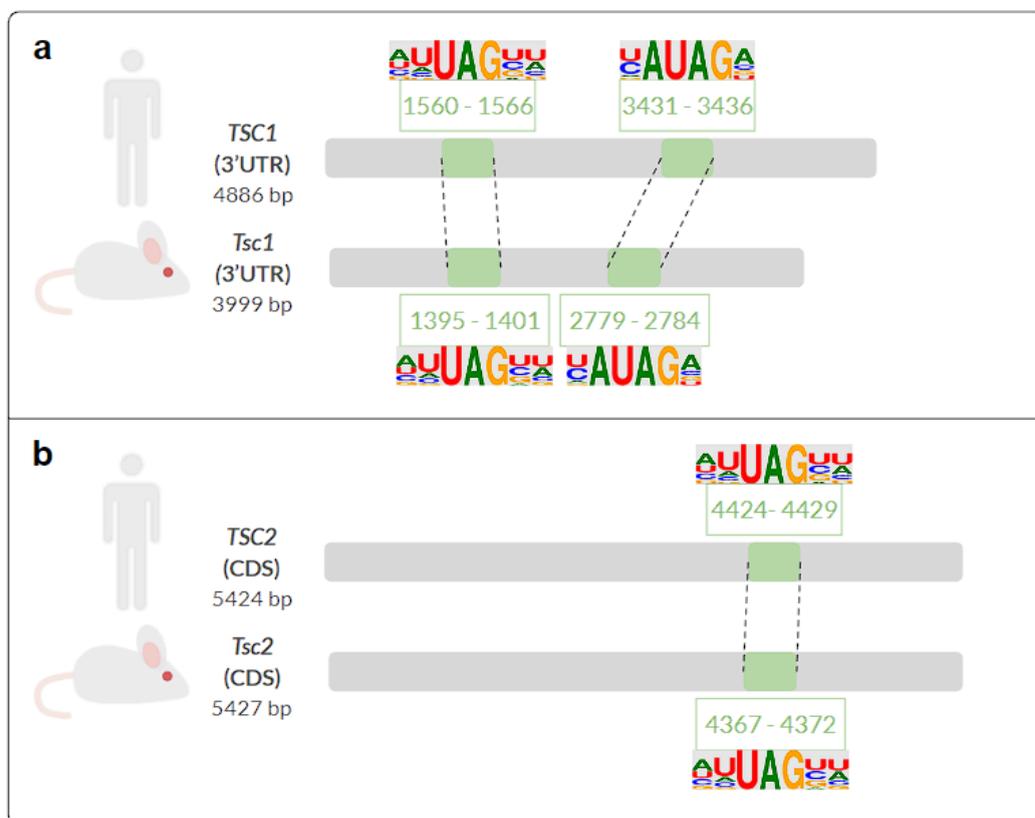


Figura 3. Elementos em *cis* com potencial para ligação à proteína UNK preditos na (a) região 3' UTR do RNAm de *TSC1* humano (NM_000368) e de camundongo (NM_001289575.2), e (b) na sequência codificadora do RNAm de *TSC2* humano (NM_000548.5) e de camundongo (NM_011647.4).

1.9. A proteína Zinc-Finger UNKEMPT

O gene *unkempt* (*unk*) foi inicialmente caracterizado em 1992, quando foi investigada a inserção de um elemento transponível na região 94E1-94E2 do cromossomo 3 de *Drosophila melanogaster* (Mohler *et al.*, 1992). Embora a inserção do transposon nesta região tivesse sido identificada anteriormente (Levis *et al.*, 1985), até aquela data nenhum estudo

funcional havia sido realizado. Mohler e colegas (1992) demonstraram que a variante era letal em homozigose, ao passo que animais portadores de uma cópia da variante apresentavam fenótipos que os distinguiam dos demais, sendo um deles a desorganização das cerdas sensoriais espalhadas pelo corpo, causando a aparência “bagunçada ou descabelada” (*unkempt*, em inglês), fenótipo que nomeou o gene. Já neste primeiro momento, a proteína codificada pelo gene foi caracterizada como pertencente à família das proteínas *zinc-finger* (ZnF), contendo motivos Cys₃His (Fig. 4a e b), notadamente encontrados em outras proteínas nucleares e fatores de transcrição que interagem com ácidos nucleicos. Além dos domínios ZnFs próximos à região N-terminal da proteína, foram identificadas também uma região rica em serina na parte central e um domínio RING *finger* C-terminal (Fig. 4a). Após a caracterização inicial do gene, diferentes ortólogos foram encontrados em metazoários, sendo *UNK* um gene evolutivamente conservado. A proteína UNKEMPT humana e seus ortólogos têm pelo menos 31% de identidade da sequência peptídica (Murn *et al.*, 2015a). Em mamíferos, além de *UNK*, há a presença de um parálogo altamente similar (87% de identidade), o gene *UNKEMPT-LIKE*, ou *UNKL* (Lorès *et al.*, 2010).

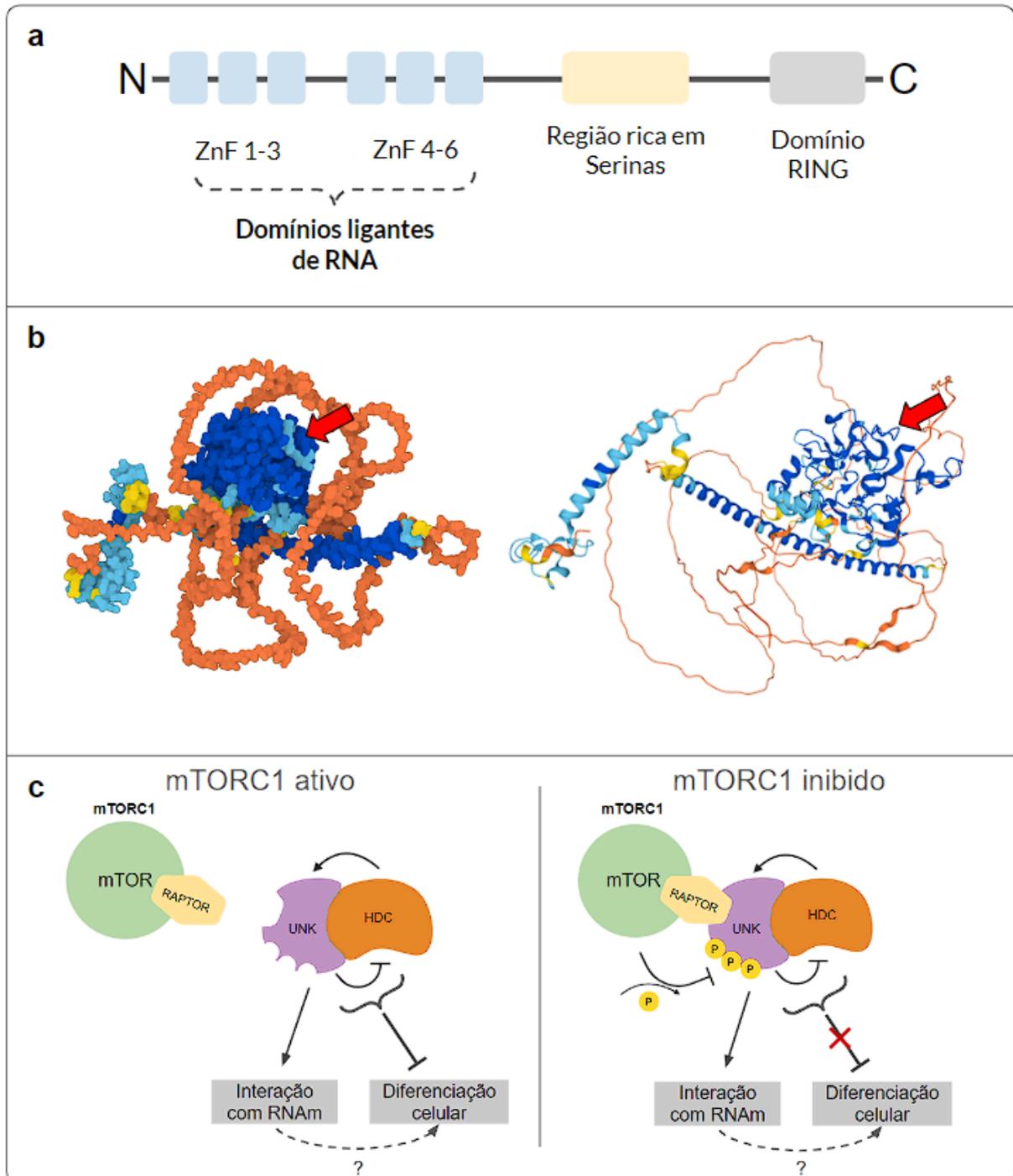


Figura 4. A proteína UNK. (a) esquema ilustrando os domínios e regiões funcionalmente ativas de UNK. (b) predição de dobramento de UNK (Uniprot: Q9C0B0) feita no software AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) e visualizada no software Mol* Viewer (Sehnal *et al.*, 2021); setas indicam a região dos domínios ZnFs N-terminais; cores representam o grau de confiança do modelo gerado (pLDDT, 0-100): azul escuro (confiança muito alta): $pLDDT > 90$; azul claro (confiança alta): $90 > pLDDT > 70$; amarelo (confiança moderada): $70 > pLDDT > 50$; laranja (confiança baixa): $pLDDT < 50$. (c) UNK é recrutada por RAPTOR e fosforilada por mTOR em mTORC1. A fosforilação de UNK inibe a indução da polarização celular causada pela proteína.

1.10 UNK, mTORC1 e o controle da diferenciação celular

Devido à presença dos domínios ZnFs, foi inicialmente hipotetizado que a função da proteína poderia estar relacionada à interação com ácidos nucleicos ou proteínas (Mohler *et al.*, 1992). De acordo, os primeiros experimentos funcionais que buscaram investigar o papel da proteína revelaram que Unk interagiu fisicamente com D-Pax2 (Avet-Rochex *et al.*, 2014) em *Drosophila*, Headcase (Hdc) em *Drosophila* (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Maierbrugger *et al.*, 2020) e humanos (Li *et al.*, 2019), Raptor em *Drosophila* (Glatter *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2019) e mamíferos (Vinsland *et al.*, 2021) e SMARCD2 em mamíferos (Lorès *et al.*, 2010). Nestes trabalhos, foi demonstrado ineditamente que Unk, junto à Hdc, são importantes para o controle temporal da diferenciação celular e desenvolvimento do olho e asas de *Drosophila* (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). Avet-Rochex e colegas (2014) mostraram que a hiperatividade de dTORC1, causada por variantes de perda de função em *tsc1* ou Rheb constitutivamente ativo, leva a diferenciação precoce de fotorreceptores no olho de *Drosophila*, ao passo que a superexpressão de Unk ou Hdc leva ao atraso da diferenciação. Além disso, a superexpressão de Unk e Hdc é suficiente para reverter o fenótipo de diferenciação precoce relacionada à hiperatividade de dTORC1 (Avet-Rochex *et al.*, 2014).

Trabalhos independentes mostram que as alterações no controle da diferenciação celular causadas pela perda de *unk* mimetiza o fenótipo observado quando há hiperatividade da via de mTORC1 em diferentes tecidos (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Maierbrugger *et al.*, 2020). Embora a importância da proteína nestes processos tenha sido validada, o mecanismo molecular por trás do fenótipo ainda não foi completamente elucidado. A natureza da ligação de Unk a Hdc ainda é pouco conhecida, embora tenha sido demonstrado que os domínios ZnFs de Unk são necessários para a interação (Maierbrugger *et al.*, 2020), e que superexpressão de Unk em *Drosophila* leva à diminuição dos níveis de Hdc, ao passo que o aumento da quantidade de Hdc está relacionado ao aumento da quantidade de Unk (Avet-Rochex *et al.*, 2014). Tendo isso em mente, a necessidade da ligação à HDC para a atividade de UNK como uma RNA-binding protein (RBP) parece improvável, uma vez que os domínios ZnFs são necessários tanto para ligação à HDC quanto para interação com RNAs, e o *knockdown* ou superexpressão de UNK é suficiente para o efeito sobre seus transcritos-alvo em mamíferos (Murn *et al.*, 2015a e 2015b), discutido em maior profundidade abaixo.

Embora a maioria dos trabalhos até o momento tenha explorado o ortólogo de *Drosophila*, recentemente, o papel de UNK tem sido investigado em mamíferos. O *knockdown*

de *UNK* com RNAs de interferência (RNAi) em células humanas SH-SY5Y causa a diminuição da polarização celular (razão axial) e a diminuição do tamanho dos processos dendríticos, ao passo que aumenta o número destes (Murn *et al.*, 2015a). Em contrapartida, a superexpressão de *UNK* em células HeLa, HepG2 e U2OS, que não têm origem neuronal, induz a polarização celular (Murn *et al.*, 2015a; Murn *et al.*, 2015b). O efeito na indução da polarização celular causado por *UNK* é dependente dos domínios ZnFs da proteína, uma vez que são necessários para resgatar o fenótipo (Murn *et al.*, 2015a). O silenciamento de *UNK* com RNAi *in vivo*, realizado por eletroporação *in utero* de embriões de camundongo (E14.5), induziu modificações no padrão de migração neuronal no córtex cerebral, associadas a uma redução na polarização celular e ao aumento no número de processos dendríticos (Murn *et al.*, 2015a). No entanto, o nocaute condicional de *Unk* em embriões de camundongo no estágio E10.5 não causou alterações no desenvolvimento do cérebro dos animais em E16.5, embora o mesmo estudo tenha relatado mudanças comportamentais que indicam o aumento da flexibilidade cognitiva nos camundongos nocaute (Vinsland *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, a relação entre *UNK* e a atividade da via de mTORC1 tem sido explorada. Uma das primeiras evidências da relação de *Unk* e a atividade de dTOR (mTOR de *Drosophila*) foi publicada em 2006, quando pesquisadores observaram o aumento da quantidade de RNAm de *unk* em células S2 de *Drosophila* após inibição de dTORC1 com rapamicina (Guertin *et al.*, 2006). Cinco anos depois, resíduos da proteína de *Unk* foram detectados em um estudo de interactoma de dTOR usando purificação por afinidade e espectrometria de massas, sugerindo, dessa vez, que a proteína pudesse ser modulada de maneira dependente da atividade de dTORC1 (Glatter *et al.*, 2011). Foi demonstrado que *UNK* interage com RAPTOR, proteína que compõe o complexo central e é essencial para a atividade de mTORC1 (Glatter *et al.*, 2011; Vinsland *et al.*, 2021). Recentemente, a natureza funcional da relação de *UNK* e mTOR foi finalmente revelada. Pesquisadores demonstraram que resíduos na região rica em serinas de *UNK* são fosforilados por mTOR de maneira dependente de mTORC1, e a fosforilação da proteína afeta sua capacidade de induzir alterações na morfologia celular, embora não pareça interferir em sua interação com RNAs (Baskaran *et al.*, 2023).

1.11 UNKEMPT: uma proteína ligante de RNA

Tratando-se de uma proteína ZnF, posteriormente investigou-se a possível interação dos domínios ZnFs de Unkempt com ácidos nucleicos. Como originalmente sugerido, foi descoberto que, além de interações proteína-proteína, Unkempt também interagia com transcritos em células humanas, no cérebro de camundongo (E15) e em ensaios *in vitro*, sendo desde então classificada na literatura como uma RBP (Baskaran *et al.*, 2023; Dominguez *et al.*, 2018; Murn *et al.*, 2015a e 2015b;). Experimentos de *pull-down* de transcritos ligados à UNK por iCLIP (*individual nucleotide resolution UV cross-linking and immunoprecipitation*) revelaram a interação com transcritos de pelo menos 263 genes em células humanas e de cérebro de camundongo (E15), muitos desses genes são importantes no controle do *turnover* proteico e morfologia celular (Murn *et al.*, 2015a). Ensaio de fracionamento ribossomal em gradiente de sacarose mostraram que UNK co-localiza com polirribossomos de maneira dependente da ligação à RNAs, indicando a possível função da proteína no controle da tradução de seus alvos (Murn *et al.*, 2015a). De fato, a análise da ocupação ribossomal de potenciais alvos de UNK revelou que a maior parte destes transcritos tem suas associações à polirribossomos diminuída quando há superexpressão de UNK, indicando a potencial inibição da tradução destes (Murn *et al.*, 2015a). Juntos, estes resultados sugerem que UNK possa controlar a tradução de transcritos de genes importantes para morfologia celular, induzindo alterações necessárias para a diferenciação celular. No entanto, o impacto concreto do controle de UNK sobre esses transcritos na diferenciação e modulação da morfologia celular ainda carece de investigação aprofundada.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se UNK atua na regulação da quantidade de transcrito e/ou proteína expressos pelos genes *TSC1* e *TSC2*.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- (i) O(s) efeito(s) da via de mTORC1 sobre a quantidade de RNAm e proteína expressos pelos genes *TSC1*, *TSC2*, *TBC1D7* e *UNK* em HEK293T; e
- (ii) Se o silenciamento de *UNK* por shRNA altera a quantidade das proteínas TSC1 e TSC2 em HEK293T.

3. Material e métodos

MATERIAL

Dados de RNA-Seq consultados online

Os dados transcriptômicos (RNA-Seq) consultados online são identificados por números na tabela 3 e as sequências utilizadas como iscas na tabela 4.

Tabela 3: Números de projetos do NCBI* consultados por BLAST.

Linhagem celular ou espécie	Origem ou tecido	SRA**	BioProject***
HEK293T	Rim embrionário humano	SRP093249	PRJNA353126
Camundongo	Músculo sóleo	SRP226516	PRJNA578743
SH-SY5Y	Neuroblastoma humano	ERP004682	PRJEB5284

*National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

**SRA: *sequence read archive*

***Bioproject: coleção de dados biológicos relacionados a uma única iniciativa de uma única organização ou consórcio.

Tabela 4: Identificação dos transcritos cujas sequências codificadoras foram utilizadas como iscas no BLAST.

Gene	Camundongo	Humano
	No. do transcrito	No. do transcrito
<i>TBC1D7</i>	ENSMUST00000179852.9	ENST00000379300.8
<i>TSC1</i>	ENSMUST00000113869.8	ENST00000298552.9
<i>TSC2</i>	ENSMUST00000227745.2	ENST00000219476.9
<i>UNK</i>	ENSMUST00000021116.12	ENST00000589666.6

Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares: HEK293T e HEK293FT. A linhagem imortalizada HEK293T é derivada de células embrionárias de rim humano imortalizadas por transdução com adenovírus, tendo sido denominadas HEK293 (Graham *et al.*, 1977) e modificada geneticamente por transformação com expressão do antígeno T (*large*) do vírus SV40 (Rio *et al.*, 1985). A linhagem celular HEK293FT é adaptada para produção elevada de lentivírus.

Oligodesoxirribonucleotídeos

As sequências de oligodesoxirribonucleotídeos utilizadas foram adquiridas de Exxtend Biotecnologia (Paulínia, São Paulo, Brasil) e estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Sequências de oligodesoxirribonucleotídeos utilizados em reação em cadeia da polimerase (PCR).

ID	Sequência (5'-3')	Número de acesso da sequência alvo*
UNK_F*	ATTATAGCGGCCCGCAGGAAGACAAGACCATGTCTGAAGGG	NM_001080419.3
UNK_R*	ATTATACTCGAGCGACTGGAGGGTGTGGGCC	NM_001080419.3

*National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Anticorpos

Os anticorpos utilizados em *Western blotting* estão apresentados na tabela 6. Anticorpos primários foram usados em diluição de 1.000 vezes, exceto o anti-tubulina em diluição 10.000 vezes. Anticorpos secundários foram usados em diluições entre 10.000 e 20.000 vezes.

Tabela 6: Anticorpos utilizados em *Western blots*.

Anticorpo	Antígeno	Empresa	Código	Espécie	Clone
<i>Anti-alpha Tubulin antibody - Loading Control</i>	Tubulina alfa	Abcam	ab4074	Coelho	Policlonal

<i>HF6</i>	TSC1	Gentilmente cedido por Vijaya Ramesh (Harvard University)	Não há	Coelho	Policlonal
<i>D93F12</i>	TSC2	Cell Signaling	4308	Coelho	Monoclonal
<i>D8K1Y</i>	TBC1D7	Cell Signaling	14949	Coelho	Monoclonal
<i>Anti-UNK antibody produced in rabbit</i>	UNK	Sigma-Aldrich	HPA023636	Coelho	Policlonal
<i>Anti-UNK unkempt antibody</i>	UNK	Abcam	ab205021	Coelho	Policlonal
<i>Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)</i>	P-S6	Signaling	2211	Coelho	Policlonal
<i>Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey)</i>	IgG de Coelho	Amersham	NA934	Asno	-
<i>Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep)</i>	IgG de camundongo	Amersham	NA931	Ovelha	-

Clones de DNA

Foi utilizado *kit* comercial contendo DNA plasmidial de quatro clones de shRNA (OriGene, Rockville, MD, EUA) em vetor pGFP-C-shLenti para expressão em mamíferos por transfecção ou produção de partículas lentivirais de terceira geração. Cada plasmídeo permite expressão de (i) gene repórter *turbo green fluorescent protein* (tGFP), sob controle do promotor CMV, (ii) gene de resistência a puromicina controlado por promotor SV40 para seleção de células de mamíferos transfectadas ou transduzidas, (iii) gene de resistência a cloranfenicol para seleção em procariotos, (iv) uma sequência clonada que leva à produção de um shRNA (A, B ou C) sob controle do promotor U6, (v) e a integração da região flanqueada pelas sequências 5'- e 3'-LTR no genoma de células humanas (Fig. 5). Os quatro plasmídeos diferem em relação à sequência de DNA para shRNA, sendo que três (A, B e C) contêm sequências dirigidas ao RNAm do gene humano *UNK* e o quarto clone tem sequência para shRNA sem alvo específico (controle negativo ou *scrambled*).

Para empacotamento e produção das partículas lentivirais de terceira geração em HEK293FT, foram utilizados os plasmídeos acessórios contendo genes para produção das

proteínas *gag* e *pol* do capsídeo de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (pMDL; Dull *et al.*, 1998), proteína *rev* de HIV (pRev; Dull *et al.*, 1998) e proteína G de envelope do vírus da estomatite vesicular (pVSV-G; Burns *et al.*, 1993).

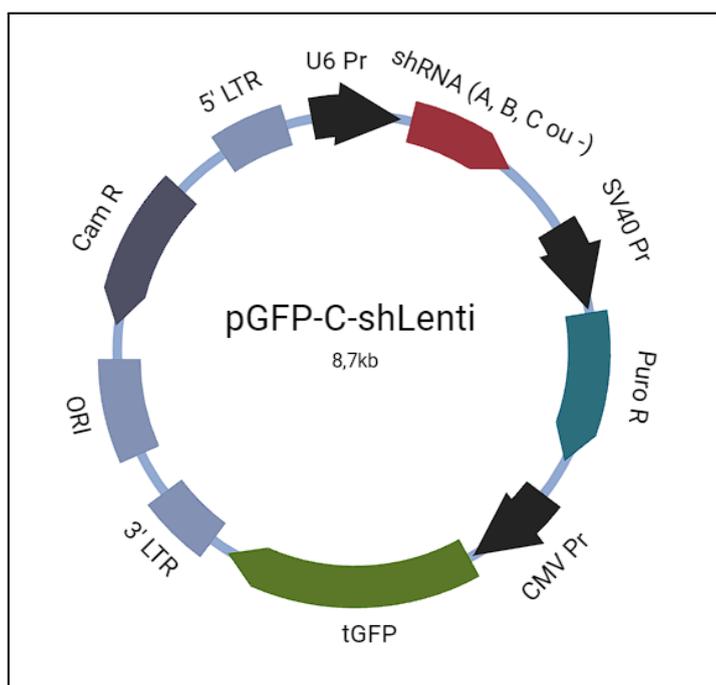


Figura 5. Esquema dos plasmídeos usados no projeto. U6 Pr = promotor U6; SV40 Pr = promotor de vírus símio 40; Puro R = gene de resistência a puromicina; CMV Pr = promotor de citomegalovírus; tGFP = gene da proteína fluorescente verde; 3' LTR e 5' LTR = regiões longas repetitivas usadas por lentivírus para integração no genoma do hospedeiro; ORI = origem de replicação em procariotos, Cam R = gene de resistência ao cloranfenicol.

MÉTODOS

Análises computacionais para quantificação de RNA *in silico*

Foram selecionados dados de sequenciamento de nova geração (NGS) de RNA poliadenilado (RNA-Seq) obtidos de plataforma Illumina e depositados no repositório *Sequence Read Archive* (SRA) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>), em buscas baseadas em amostras submetidas a tratamento com rapamicina. A quantidade de transcritos dos genes, normalizada em *Transcripts Per Kilobase per Million* (TPM), foi calculada pela ferramenta GEO2R (Gene Expression Omnibus; Clough e Barrett, 2016) quando disponível. Projetos não disponíveis para análise com GEO2R, foram analisados por BLAST (Basic Local Alignment Search Tool,

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde cada isca foi submetida a alinhamento de nucleotídeos contra um conjunto de dados individual, identificado pelo seu número de acesso. A quantidade de transcritos de cada gene foi avaliada pelo número de *reads* recuperadas de acordo com os seguintes parâmetros: significância (*expected value*) abaixo de 2×10^{-15} e 100% de identidade. O número de *reads* de cada gene e busca foi convertido para *Reads Per Kilobase per Million* (RPKM), valor que normaliza por tamanho (em número de quilobases) da sequência codificadora usada como isca e tamanho (em milhões de bases, Mb) da biblioteca.

Cultivo celular

HEK293T foi utilizada entre as passagens 35 e 48 e cultivada em placa aderente com meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%, penicilina/estreptomicina a 1%, GlutaMAX™ a 1% (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), piruvato de sódio a 1%, referido a partir daqui como meio DMEM completo, e mantida a 37°C e CO₂ a 5%. As células foram mantidas em 60-90% de confluência. Lavagens foram realizadas com *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS, Gibco™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para carenciamento, o cultivo foi realizado nessas condições, embora sem FBS, glutamina e piruvato de sódio. Para seleção de HEK293T cultivadas em placas aderentes de 24 poços com meio DMEM completo, foi realizada uma curva de titulação que definiu puromicina (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 0,7 µg/mL. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e no nono dia a seleção foi interrompida.

HEK293FT foi cultivada em placa aderente com DMEM completo ao qual foram acrescentados aminoácidos não essenciais para a concentração de 1% (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e mantida a 37°C e CO₂ a 5% até atingir 70% de confluência.

Passagens de células foram realizadas por incubação em TrypLE™ (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguido de inibição de sua atividade proteolítica pelo acréscimo de FBS e ressuspensão em meio DMEM completo. Contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer.

RT-PCR

O cDNA usado como molde em reação em cadeia da polimerase após transcriptase reversa (RT-PCR) foi sintetizado a partir de RNA total extraído de HEK293T por TRIZOL (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para síntese de cDNA utilizou-se o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). RT-PCR do cDNA de *UNK* foi realizada com enzima TaKaRa LA Taq® DNA polymerase (TaKaRa Bio., Kusatsu, Shiga, JP), seguindo as condições do fabricante.

Extração proteica

Células HEK293T foram lavadas duas vezes com DPBS, cuidadosamente coletadas com raspador, ressuspensas em DPBS e centrifugadas a 6000 X g a 4°C por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado em tampão de lise (Tris-HCl a 50 mM pH 8,0, NaCl a 150 mM, NP-40 a 0,5%, EGTA a 2 mM, NaF a 50 mM, Na₃VO₄ a 5 mM, e coquetel de inibidor de protease 1X (Roche, Basel, Suíça), incubado em gelo por 30 minutos e centrifugado a 15.000 X g durante 20 minutos a 4°C. A fração solúvel foi coletada e usada nos experimentos subsequentes.

Quantificação de lisado e *Immunoblotting*

A quantificação de conteúdo proteico dos lisados de células HEK293T foi feita por ensaio de ácido bicinonínico, utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo o protocolo da fabricante. A leitura da absorbância (562 nm) foi realizada no leitor de placas Biotek Synergy H1 (Agilent). Quinze ou 30 µg de proteínas de lisado de células HEK293T foram submetidos a eletroforese em tampão de corrida (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3,5 mM) em gel de poliacrilamida-SDS de concentrações variáveis, a depender da massa molecular da proteína (14%, para 4EBP1, P-4EBP1, S6, P-S6 e TBC1D7; e 6% para TSC1, TSC2 e UNK). As proteínas foram transferidas (25V, 16 hs) em tampão de transferência (Tris-base 24 mM, glicina 196 mM) a membrana de nitrocelulose e nela bloqueadas por 2h em TBS (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM) suplementado com tween-20 a 0,0005% (TBS-T) e caseína a 1%, a temperatura ambiente sob agitação leve. Três lavagens da membrana por cinco minutos cada

após cada etapa foram em TBS-T. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos. A incubação com o anticorpo primário foi em TBS-T suplementado com albumina sérica bovina (BSA, livre de imunoglobulinas, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA) a 2%, a 4°C, por 16 hs sob agitação. A incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase de raiz forte (HRP) foi em TBS-T suplementado com BSA a 2%, por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. A incubação com ECL Prime™ (Cytiva, Marlborough, MA, EUA) foi por cinco minutos e o sinal de quimioluminescência foi capturado no fotodocumentador ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). A quantificação do sinal das bandas referentes às proteínas foi realizada no software ImageJ. Os valores dos sinais das bandas das proteínas de interesse foram normalizados pelos sinais do *loading control* (alfa-tubulina) em suas respectivas canaletas. A razão do sinal (proteína de interesse/controlado) foi usada para comparação entre as diferentes condições experimentais.

Tratamento de HEK293T com rapamicina

HEK293T (~5x10³ células por poço de placas de 96 poços), cultivadas em meio DMEM completo por 24h, foram carenciadas por 24h e então o meio foi trocado pelo mesmo meio de carenciamento mas suplementado com rapamicina (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, GER) a 20, 40, 80, 160, 320, 640 nM ou DMSO (Fig. 6). As células foram incubadas por outras 24h. Para os experimentos de *Western blotting*, 7x10⁵ células foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro em meio DMEM carenciado suplementado com rapamicina a 640 nM.

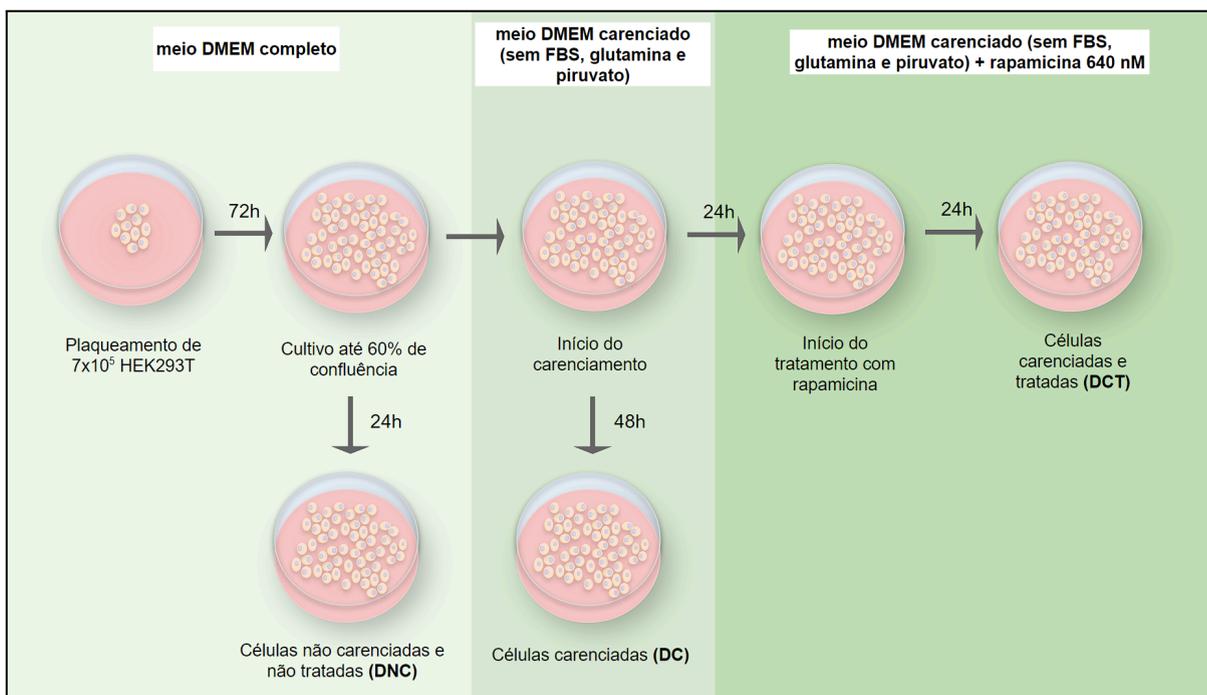


Figura 6. Ilustração do experimento de carenciamento seguido de tratamento com rapamicina para extração proteica.

Ensaio de viabilidade celular com sal de tetrazolium

Células HEK293T foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com o kit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. A absorbância foi medida no leitor de placas Biotek Synergy H1 (Agilent). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas (Fig. 7).

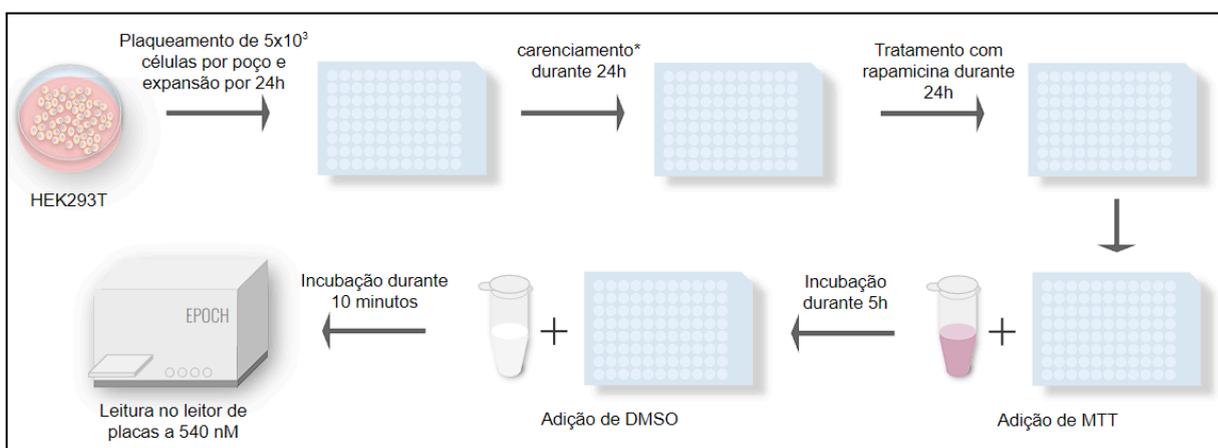


Figura 7. Ilustração do experimento de carenciamento seguido de tratamento com titulação de rapamicina para ensaio de viabilidade celular. * = incubação com meio DMEM carenciado (sem FBS, glutamina e piruvato de sódio).

Produção das partículas lentivirais

Células HEK293FT foram utilizadas para produção de partículas virais (Fig. 8). Para cada tipo de partícula lentiviral produzida foram usadas três placas de 100 mm. Foi utilizada uma mistura com 14,64 µg de plasmídeo pGFP-C-shLenti shRNA anti-UNK (A, B ou C) ou controle negativo (scrambled), 9,72 µg de plasmídeo pMDL, 3,72 µg de plasmídeo REV, 4,92 µg do plasmídeo VSVG, 132 µL de polietilenoimina linear (PEI 25K; Polysciences, Inc., Warrington, PA, EUA) e volume final ajustado para 1,532 mL com DMEM. As placas contendo HEK293FT tiveram seus meios trocados, sendo adicionados 8 mL de meio DMEM completo subtraído o FBS. Em seguida, 0,5 mL da mistura foi adicionado às placas. Doze horas após a transfecção, o meio foi trocado por meio completo. Setenta e duas horas após a transfecção, o sobrenadante das placas foi coletado em seringa e filtrado através de membrana 0.22 µM (*low-protein binding*; Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Alemanha). O sobrenadante coletado foi submetido a ultracentrifugação a 100.000 X g para concentração das partículas lentivirais, ressuspensão em 200 µL de DMEM e armazenado em criotubos a -80°C.

Transdução e estabelecimento de linhagens de expressão estável

Partículas lentivirais contendo vetor pGFP-C-shLenti foram utilizadas para transdução da linhagem celular HEK293T (Fig. 8). Células HEK293T foram cultivadas em placas de Petri (100 mm) para adesão celular seguido de passagem de 50.000 células para cada poço de placa de 12 poços. Vinte e quatro horas após plaqueamento, o meio foi trocado por 800 µL de meio DMEM mínimo suplementado por 200µL de DMEM com partículas lentivirais e 5 µg de polibreno (Merck Millipore, Merck, Darmstadt, Alemanha). Seis horas após início da transdução, foi adicionado 1 mL de meio completo sendo o FBS a 20% e, 18 hs mais tarde, o meio foi trocado por meio completo. Setenta e duas horas após o início da transdução, deu-se início à seleção de células transduzidas com puromicina. As linhagens obtidas após transdução de HEK293T foram denominadas shRNA A, shRNA B, shRNA C e shRNA -.

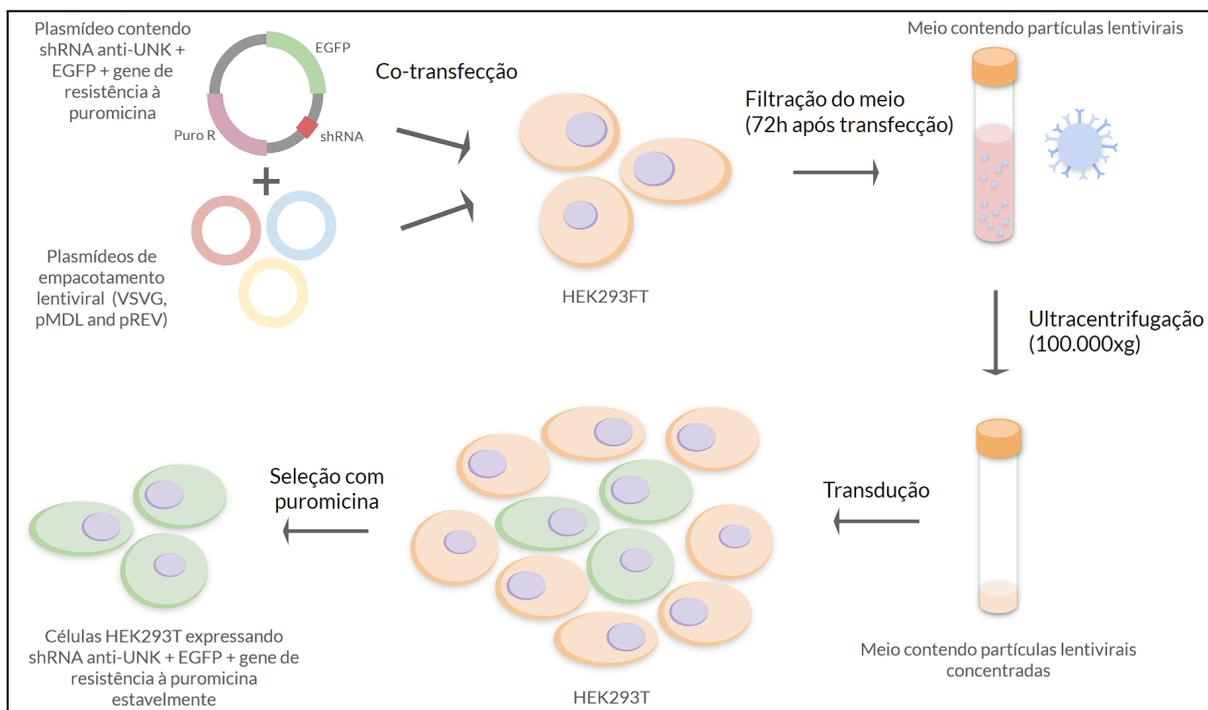


Figura 8. Ilustração da metodologia para o estabelecimento de células HEK293T expressando shRNA anti-UNK estavelmente.

Preparação de lâminas e microscopia de fluorescência

Lamínulas de vidro (24 mm X 24mm) foram lavadas com etanol a 70% e irradiadas com UV durante 30 minutos e colocadas em poços de placas de seis poços. Células HEK293T das diferentes linhagens foram acrescentadas e incubadas por 24h a 37°C e CO₂ a 5%. Após 24h, os poços foram lavados com 1 mL de DPBS por duas vezes, incubados com 2 mL de paraformaldeído a 4% por 20 minutos, a temperatura ambiente e lavados novamente duas vezes com DPBS. As lamínulas foram retiradas dos poços e transferidas para uma câmara úmida, permeabilizadas com triton-X-100 0,3% em DPBS por 30 minutos, coradas com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e seladas com esmalte. As imagens de microscopia de fluorescência foram obtidas pelo microscópio multifóton Leica TCS SP8 MP (Leica Microsystems, Alemanha).

Testes estatísticos

Os testes estatísticos e gráficos foram feitos no software GraphPad Prism versão 9.5.1 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, www.graphpad.com). Teste t-student $\alpha =$

0,05; teste One-way ANOVA $\alpha = 0,05$ com teste *post-hoc* de Dunnet $\alpha = 0,05$; teste de normalidade Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$.

4. Resultados

Este trabalho teve três abordagens (Fig 9): (A) quantificação relativa *in silico* de RNAm dos genes deste estudo, baseada em conjuntos de dados transcriptômicos de (i) HEK293T tratada com rapamicina, (ii) camundongos tratados com rapamicina e (iii) linhagem SH-SY5Y submetida ao *knockdown* de *UNK*; (B) (i) detecção da expressão das proteínas de interesse ao projeto em HEK293T e (ii) avaliação de quantidades proteicas específicas após inibição de mTOR por tratamento de HEK293T com rapamicina; e (C) *knockdown* de *UNK* em HEK293T.

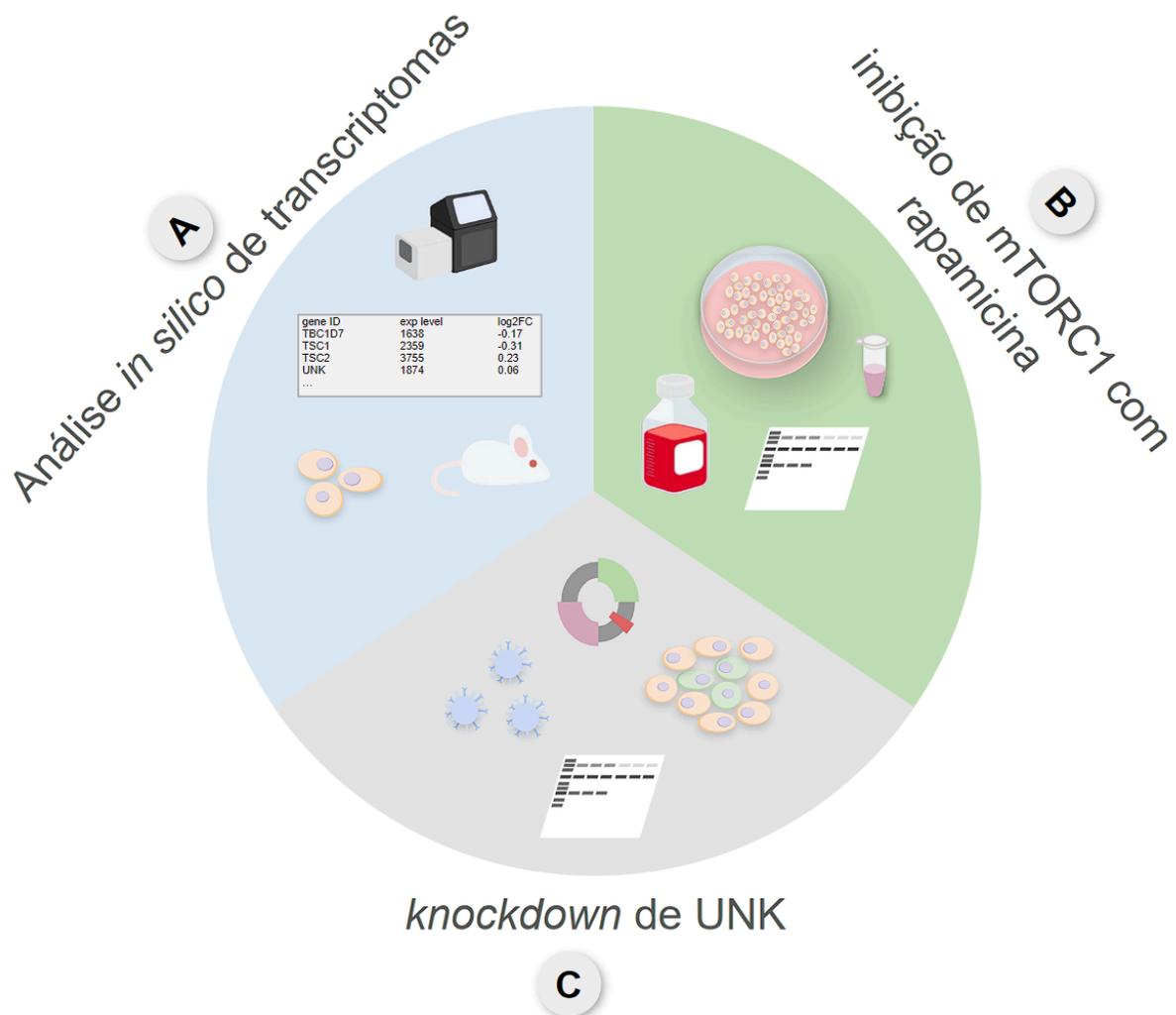


Figura 9. Ilustração das três abordagens utilizadas neste projeto.

A. Abordagem 1: análise *in silico* de RNAm em células com modulação *in vitro* ou *in vivo* de mTORC1

A.1 Análise de RNA-Seq de HEK293T tratadas com rapamicina

Para entender se a inibição da via de mTORC1 pode alterar a quantidade de transcritos de genes de interesse ao projeto, utilizamos conjuntos de dados de RNA-Seq de células HEK293T tratadas com rapamicina a 22 nM durante 72h (Martinez-Nunez *et al.*, 2016).

As células tratadas com rapamicina apresentaram aumento na quantidade de transcritos de *TSC2* ($p = 0,021$) quando comparadas ao controle não tratado (Fig 10). Os demais genes (*TSC1*, *TBC1D7* e *UNK*) não apresentaram alteração significativa na quantidade de transcritos, embora a comparação da quantidade de RNAm de *UNK* entre os dois grupos tenha gerado um valor de $p = 0,08$ (Fig. 10).

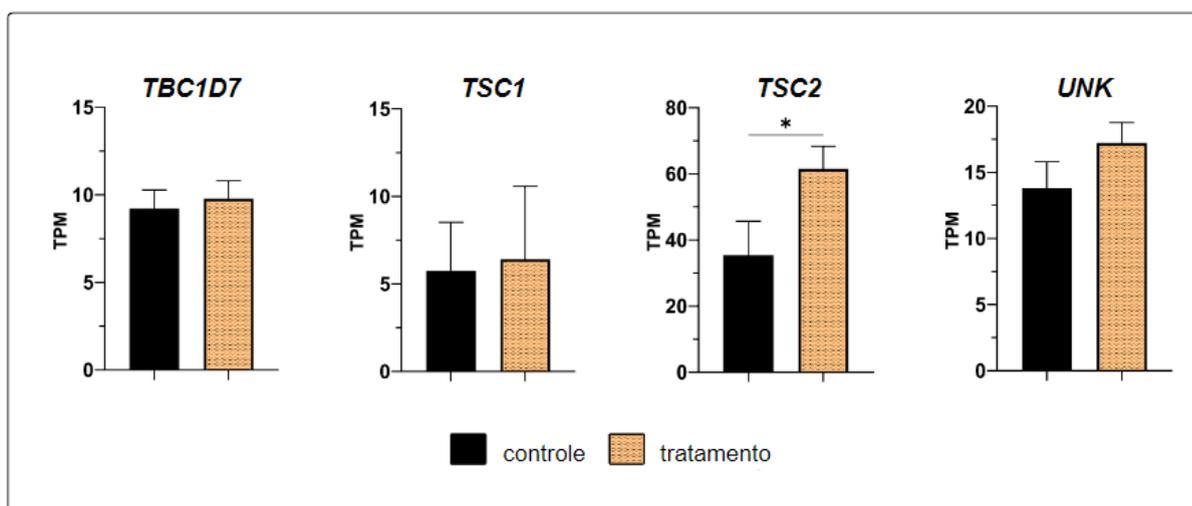


Figura 10. Quantidade de transcritos em *Transcripts Per Kilobase Million* (TPM) dos genes indicados em células HEK293T tratadas com rapamicina (22 nM) e controle, $n = 3$. Teste *t-Student*. * = $p < 0,05$. *TBC1D7*: $p = 0,53$; *TSC1*: $p = 0,83$; *TSC2*: $p = 0,02$; *UNK*: $p = 0,08$.

A.2 Análise de RNA-Seq de músculo esquelético de camundongos

Conjuntos de RNA-Seq estão disponíveis de projeto em que camundongos machos de 15 meses foram submetidos a três condições dietéticas: dieta restritiva (restrição calórica), dieta suplementada com rapamicina (42 mg/kg de ração) ou controle (dieta suplementada com veículo) durante 15 meses. Ao final do tratamento, RNA foi extraído do músculo sóleo e sequenciado (Ham *et al.*, 2020).

Não observamos diferenças entre os grupos controle e dieta restritiva para a quantidade de RNA de *Unk*, *Tsc1*, *Tsc2* ou *Tbc1d7* (Fig. 11a). A comparação entre o controle e o grupo de animais tratados com rapamicina mostrou diminuição significativa na quantidade de transcritos de *Tbc1d7* ($p = 0,02$) e *Tsc1* ($p = 0,007$) nos animais tratados (Fig. 11b). O oposto ocorreu quando avaliamos a expressão de *Tsc2*, havendo aumento significativo ($p = 0,02$) de transcritos do gene nos animais tratados (Fig. 11b). Nenhuma alteração foi detectada para os transcritos de *Unk* ($p = 0,84$).

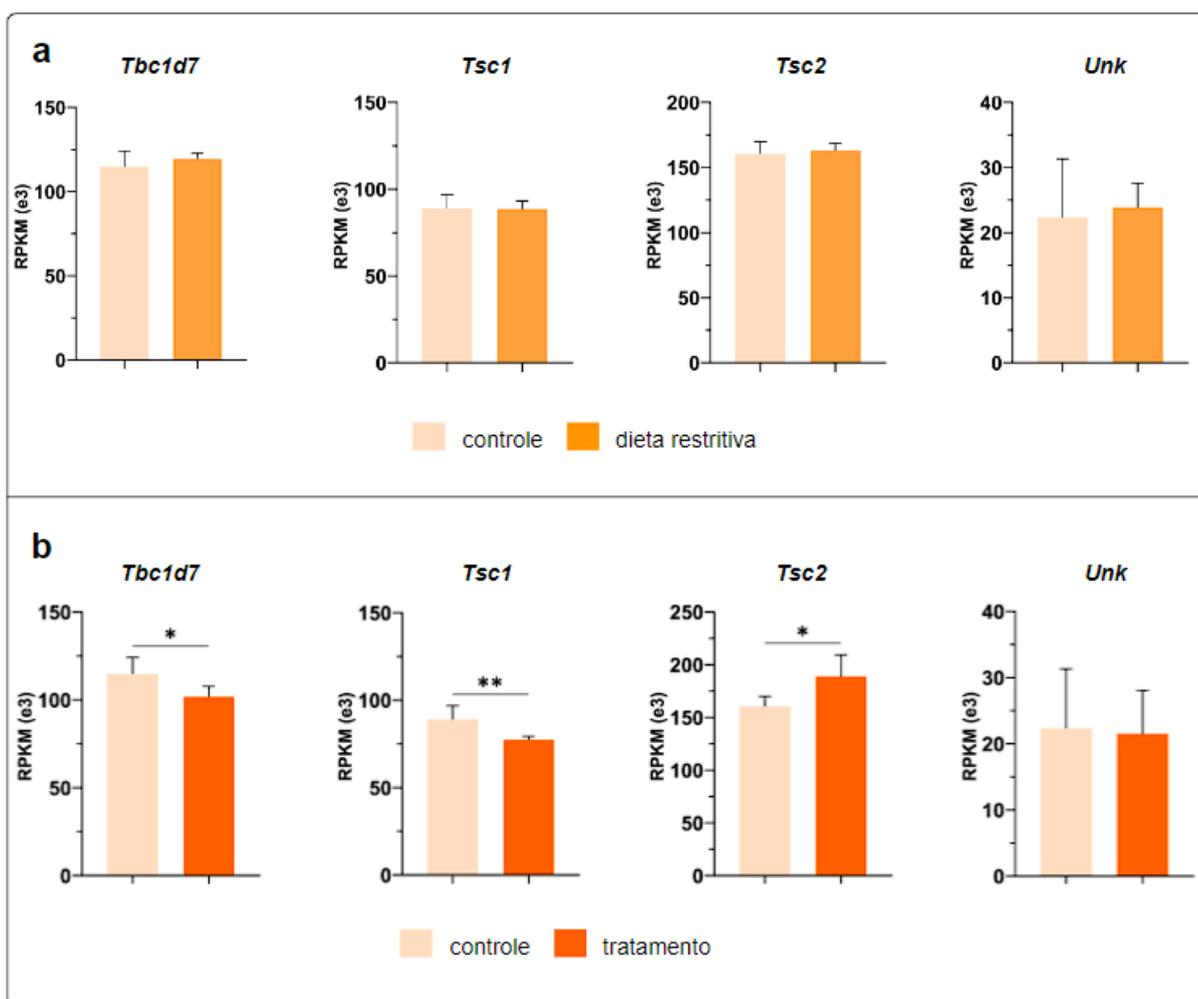


Figura 11. Quantidade de transcritos, em *Reads Per Kilobase Million* (RPKM), que se alinham à CDS de referência dos genes indicados. RNA-Seq de camundongos controle ($n = 5$), (a) alimentados com dieta restritiva ($n = 6$) ou (b) suplementada com rapamicina ($n = 6$). Teste *t-Student*. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. **a:** *Tbc1d7*: $p = 0,29$; *Tsc1*: $p = 0,94$; *Tsc2*: $p = 0,63$; *Unk*: $p = 0,71$. **b:** *Tbc1d7*: $p = 0,02$; *Tsc1*: $p = 0,007$; *Tsc2*: $p = 0,02$; *Unk*: $p = 0,84$.

A.3 Análise de RNA-Seq de células SH-SY5Y submetidas a *knockdown* de *UNK*

O conjunto de dados de transcriptoma de células humanas SH-SY5Y com expressão de shRNA anti-*UNK* (Murn *et al.*, 2015a) foi avaliado e confirmou a redução da quantidade de transcritos de *UNK* ($p = 0,002$) nas células geneticamente modificadas, como esperado (Fig. 12). A quantidade de transcritos de *TSC2* reduziu-se em células SH-SY5Y com *knockdown* de *UNK*, quando comparadas ao controle (Fig. 12). Nenhuma diferença foi observada na quantidade de transcritos de *TSC1* ou *TBC1D7* entre os grupos (Fig. 12).

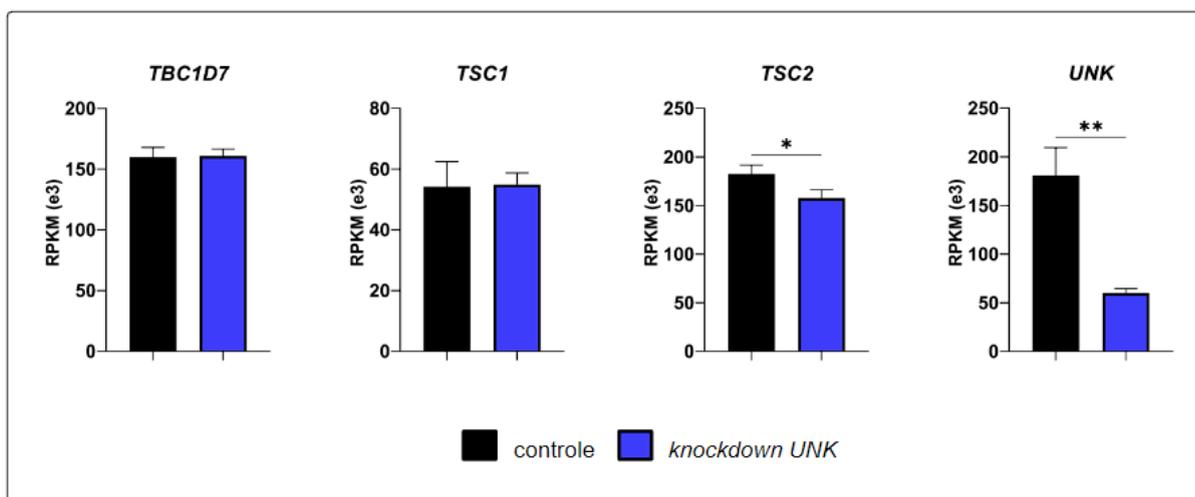


Figura 12. Quantidade de transcritos em *Reads Per Kilobase Million* (RPKM) que se alinham à CDS de referência dos genes indicados em células SH-SY5Y *knockdown* de *UNK* e controle, $n = 3$. Teste *t-Student*. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. *TBC1D7*: $p = 0,89$; *TSC1*: $p = 0,90$; *TSC2*: $p = 0,03$; *UNK*: $p = 0,002$.

B. Abordagem 2: expressão proteica e tratamento de HEK293T com rapamicina

B.1 As proteínas TSC1, TSC2, TBC1D7 e UNK são expressas em células HEK293T

HEK293T é uma linhagem celular derivada de tecido renal fetal humano (Graham *et al.*, 1977; Dubridge *et al.*, 1987). Esta linhagem tem sido vastamente utilizada para modificação genômica dos genes *TSC1* ou *TSC2* e avaliação do efeito de variantes patogênicas sobre a via de mTOR (Almeida *et al.*, 2020; Hoogeveen-westerveld *et al.*, 2011; Nellist *et al.*, 2005; Nellist *et al.*, 2008; Wentink *et al.*, 2011). Por isso e pela facilidade de seu manuseio, escolhemos HEK293T para realizarmos nossos experimentos de análise de expressão gênica.

Com a finalidade de confirmar que a linhagem HEK293T é um modelo adequado para avaliar a expressão das proteínas importantes para o projeto, cDNA foi preparado a partir de RNA total extraído dessas células. RT-PCR de *UNK* validou a expressão de RNAm do gene na linhagem (Fig. 13a). Para avaliar se o RNAm de *UNK* é traduzido nesta linhagem celular, *immunoblotting* de 30 µg de lisado de HEK293T confirmou a expressão da proteína (Fig. 13b). Em *immunoblotting* de HEK293T, observaram-se também as demais proteínas de interesse ao projeto: TBC1D7, TSC1 e TSC2 (Fig. 13b).

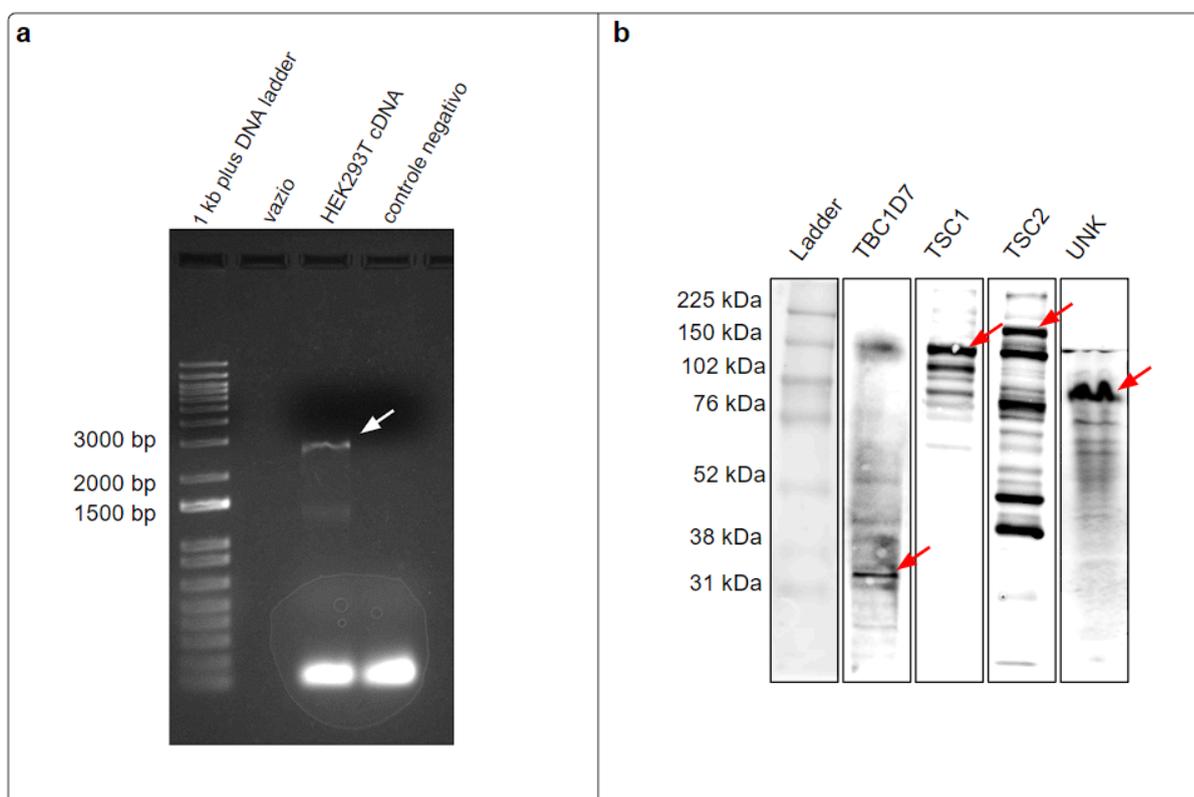


Figura 13. Validação da expressão das proteínas relevantes ao projeto em HEK293T. (a) RT-PCR de cDNA de HEK293T com iniciadores para o transcrito 1 de *UNK*, o amplicom com tamanho esperado de aproximadamente 2400 bp está indicado por seta. (b) *Immunoblotting* de 30 µg de lisado de HEK293T com anticorpos dirigidos às proteínas indicadas. As setas indicam a banda esperada para a isoforma de referência das proteínas: TBC1D7 (28 kDa), TSC1 (129 kDa), TSC2 (200 kDa) e UNK (88 kDa).

B.2 Avaliação da quantidade de proteína de UNK, TSC1, TSC2 e TBC1D7 após inibição da via de mTORC1 por rapamicina

A atividade de mTORC1 tem sido relacionada à expressão diferencial de RNAm de determinados genes e à diminuição na ocupação ribossomal de um conjunto de transcritos (Thoreen *et al.*, 2012). Não se conhece bem se a atividade de UNK ao nível traducional poderia regular a via de mTORC1 ao restringir a quantidade proteica. Para investigar se a modulação da atividade da via resultaria em alterações nos níveis de proteínas relevantes ao projeto, foi avaliado o efeito da inibição de mTORC1 por rapamicina em células HEK293T.

Inicialmente, determinou-se se o tratamento com rapamicina em concentrações entre 20 e 640 nM tem efeito sobre a viabilidade de células HEK293T. Não se observou diferença significativa na viabilidade celular de HEK293T tratada (Fig. 14a). A proteína S6 fosforilada (P-S6) é um repórter da atividade de mTORC1 (Hay e Sonenberg, 2004; Ruvinsky *et al.*, 2005). *Immunoblotting* usando anticorpos direcionados a S6 total e especificamente S6 fosforilada no resíduo Ser^{235/236} (P-S6) mostrou a redução da fosforilação da proteína com carenciamento e carenciamento e tratamento, como esperado (Fig. 14b).

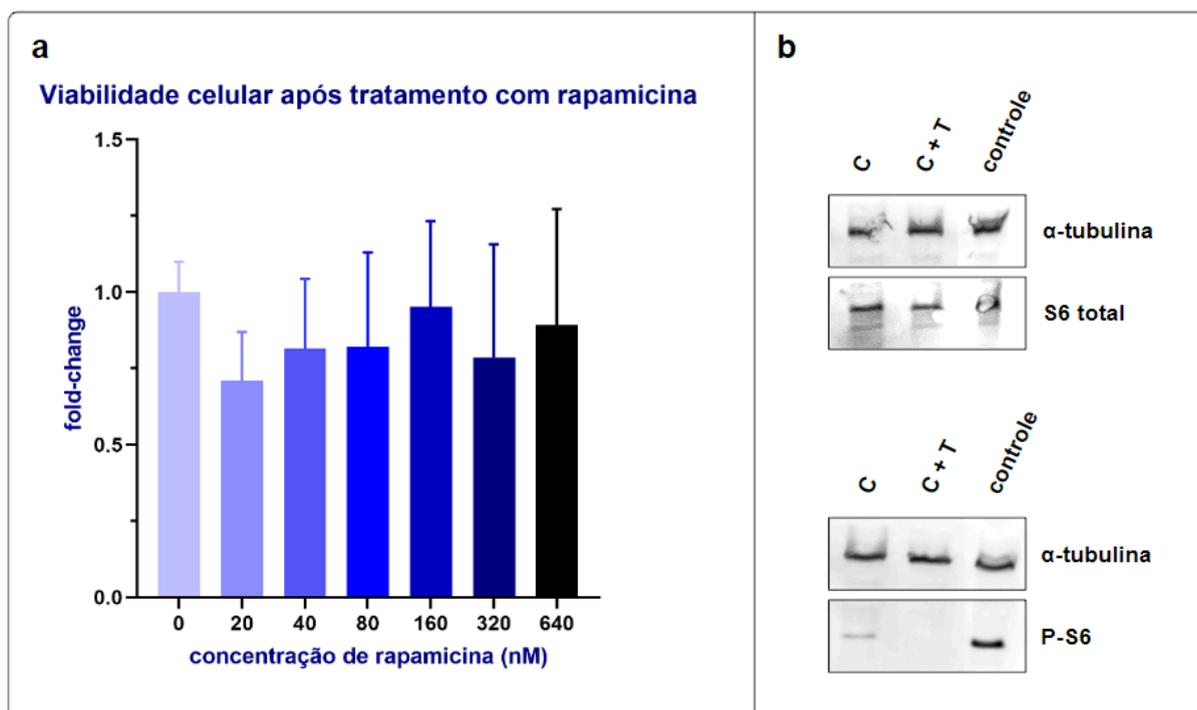
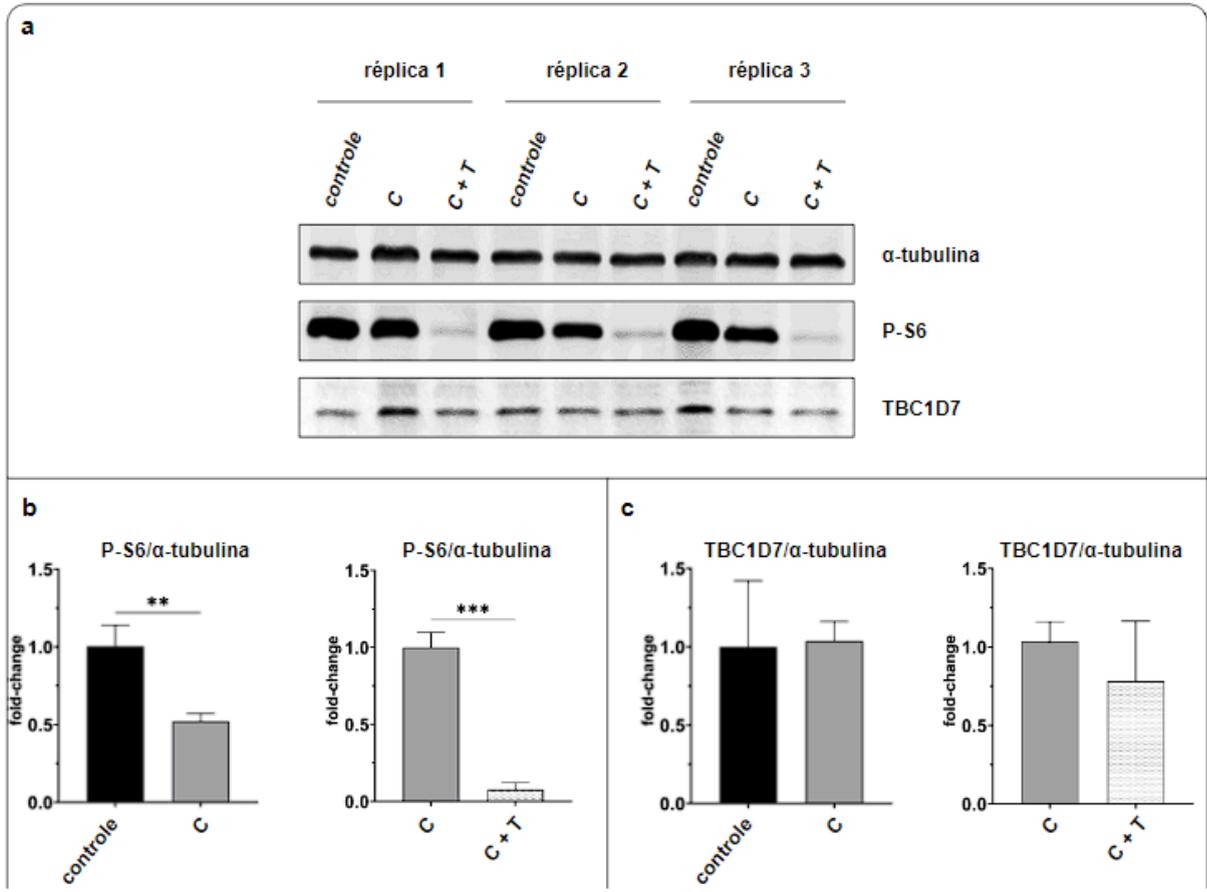


Figura 14. Tratamento de HEK293T com rapamicina. (a) *Fold-change* da viabilidade celular de células HEK293T tratadas com diferentes concentrações de rapamicina em relação ao controle (0 nM/DMSO), $n = 3$. Nenhuma diferença significativa foi observada pelo teste One-way ANOVA com *post-hoc* de Dunnet ($p = 0,87$). (b) comparação da intensidade dos sinais de S6 total e P-S6 em *immunoblotting* de células HEK293T controle, carenciadas (C) ou carenciadas e tratadas com rapamicina a 640 nM (C + T).

Buscando entender se a inibição da via de mTORC1 causaria alguma modificação na quantidade de proteínas relevantes ao projeto, realizamos o experimento com a concentração mais elevada de rapamicina após carenciamento de células HEK293T. A quantidade de P-S6 reduziu-se em células somente carenciadas ($p = 0,004$) ou tratadas com rapamicina após carenciamento ($p = 1 \times 10^{-4}$) (Fig. 15a e b) quando comparadas aos respectivos controles. Houve aumento significativo ($p = 0,016$) na quantidade de UNK após carenciamento das células, embora o tratamento com rapamicina não tenha revelado efeito significativo (Fig. 15g). O carenciamento com ou sem tratamento por rapamicina não afetou a quantidade de proteínas TSC1, TSC2 e TBC1D7, componentes do complexo inibidor de mTOR na via de mTORC1 (Fig. 15c-f).



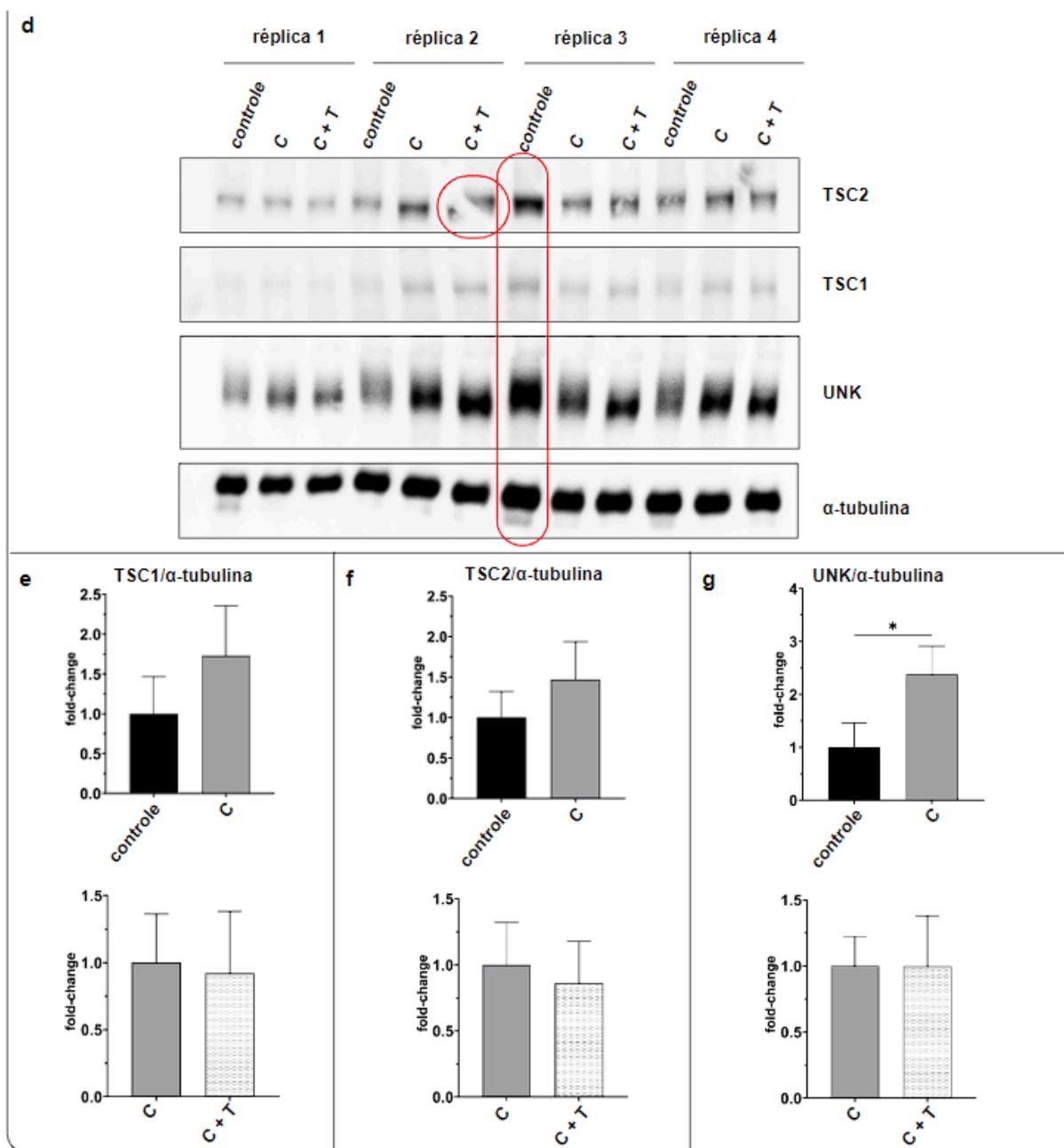


Figura 15. Immunoblotting de HEK293T após carenciamento e inibição de mTORC1 com rapamicina. (a) Membrana incubada com anticorpos dirigidos às proteínas α -tubulina (*loading control*), P-S6 e TBC1D7. (b) quantidade de proteína S6 fosforilada (P-S6) após carenciamento e carenciamento e tratamento. (c) quantidade de proteína TBC1D7. Controle; C = carenciamento; C + T = carenciamento e tratamento com rapamicina 640 nM, n = 3 (d) Membrana incubada com anticorpos dirigidos às proteínas α -tubulina, TSC1, TSC2 e UNK. (e) quantidade de proteína TSC1, (f) TSC2 e (g) UNK. Controle (n = 3); C = carenciamento (n = 4); C + T = carenciamento e tratamento com rapamicina 640 nM (n = 4). As bandas destacadas em vermelho foram excluídas da análise. Teste *t-Student*, * $p = 0,016$, ** $p = 0,004$, *** $p = 1 \times 10^{-4}$. **b:** $p = 0,004$ para C e $p = 1 \times 10^{-4}$ para C+T; **c:** $p = 0,89$ para C e $p = 0,33$ para C+T; **e:** $p = 0,15$ para C e $p = 0,79$ para C+T; **f:** $p = 0,2$ para C e $p = 0,56$ para C+T; **g:** $p = 0,016$ para C e $p = 0,99$ para C+T).

C. Abordagem 3: *knockdown* de *UNK* em HEK293T

C.1 Produção de células HEK293T expressando shRNA dirigido a *UNK*

Foi realizado o processo de *knock-down* da proteína UNK usando RNAs de interferência (RNAi). Para gerar células HEK293T que expressem shRNAs anti-*UNK* de forma estável, utilizamos quatro plasmídeos de expressão em mamíferos. Cada plasmídeo expressa um shRNA único cujos sítios de ligação foram preditos para o RNAm de *UNK* humano ou um shRNA controle (*scrambled*) sem alvo específico. Esses plasmídeos denominam-se shRNA A, shRNA B, shRNA C e shRNA (controle negativo ou *scrambled*). Além da expressão dos shRNAs, os plasmídeos também apresentam cassete de expressão de GFP como gene repórter e gene de resistência a puomicina para seleção de células transduzidas.

Optamos pela produção de partículas lentivirais em estudo colaborativo com o Prof. Carlos F. M. Menck (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo). Partículas lentivirais contendo os plasmídeos de expressão de shRNA foram produzidas em HEK293FT e usadas na transdução de células HEK293T. A eficiência da transdução foi determinada por microscopia de fluorescência por emissão de fluorescência na faixa do GFP ($\lambda \sim 500$ nm) pelas células transduzidas à excitação por LASER, ao passo que células selvagens apresentaram baixa emissão (Fig. 16a-e). A localização do sinal de GFP foi majoritariamente citoplasmática, de acordo com o esperado.

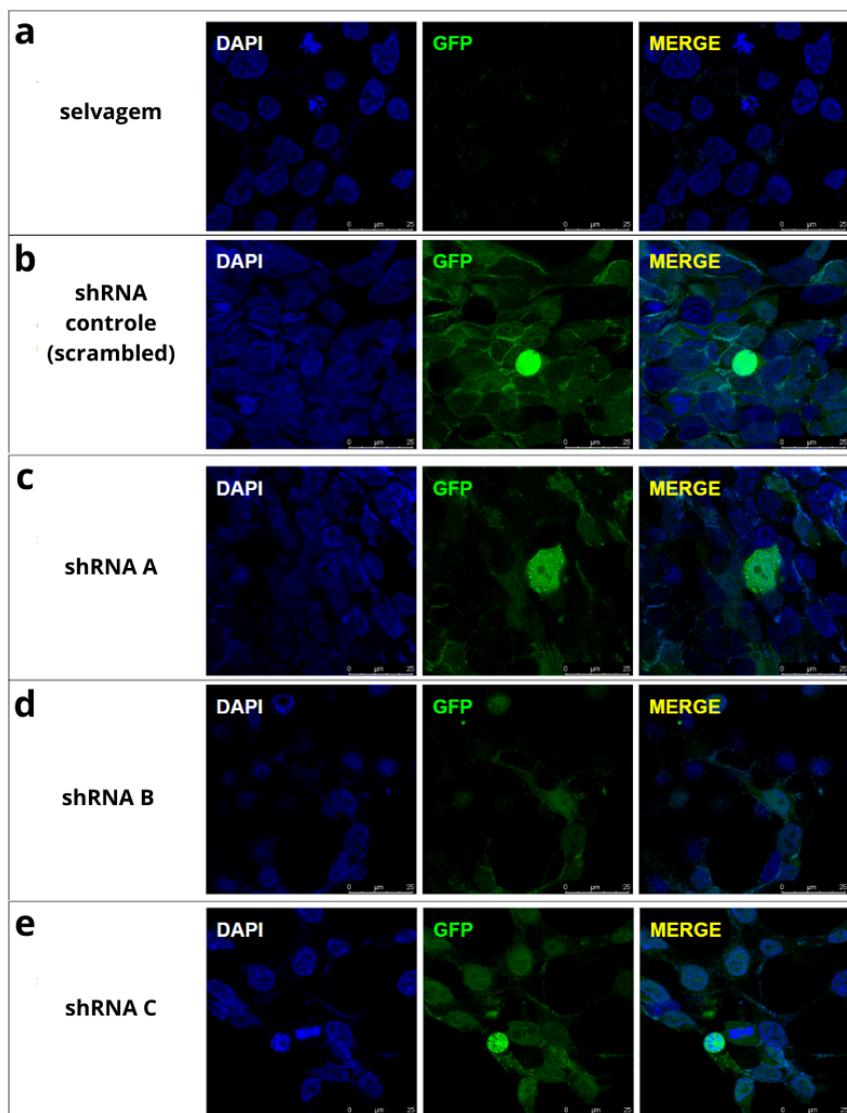


Figura 16. Microscopia de fluorescência de células HEK293T. (a) HEK293T selvagens ou transduzidas (b – e) com partículas lentivirais contendo plasmídeos de expressão de (b) shRNA controle negativo (*scrambled*), (c) shRNA A, (d) shRNA B, (e) shRNA C.

Uma vez que a expressão do gene repórter foi confirmada, indicando que o plasmídeo está no núcleo celular, avaliou-se por *immunoblotting* o efeito do plasmídeo sobre a expressão de UNK (Fig. 17a). A quantidade de proteína UNK não diferiu entre as células transduzidas com os shRNAs A ou B comparadas às células transduzidas com o controle *scrambled* (Fig. 17b e c). Por outro lado, células transduzidas com o shRNA C tiveram uma redução significativa ($p = 0,038$) na quantidade de UNK quando comparadas ao controle (Fig. 17d). A quantidade de proteínas TSC1 ou TSC2 nas células transduzidas (Fig. 17e) não apresentou diferença entre as células transduzidas com shRNAs anti-UNK e controle (Fig. 17f-k), nem em células onde houve redução significativa de UNK (Fig. 17h e k).

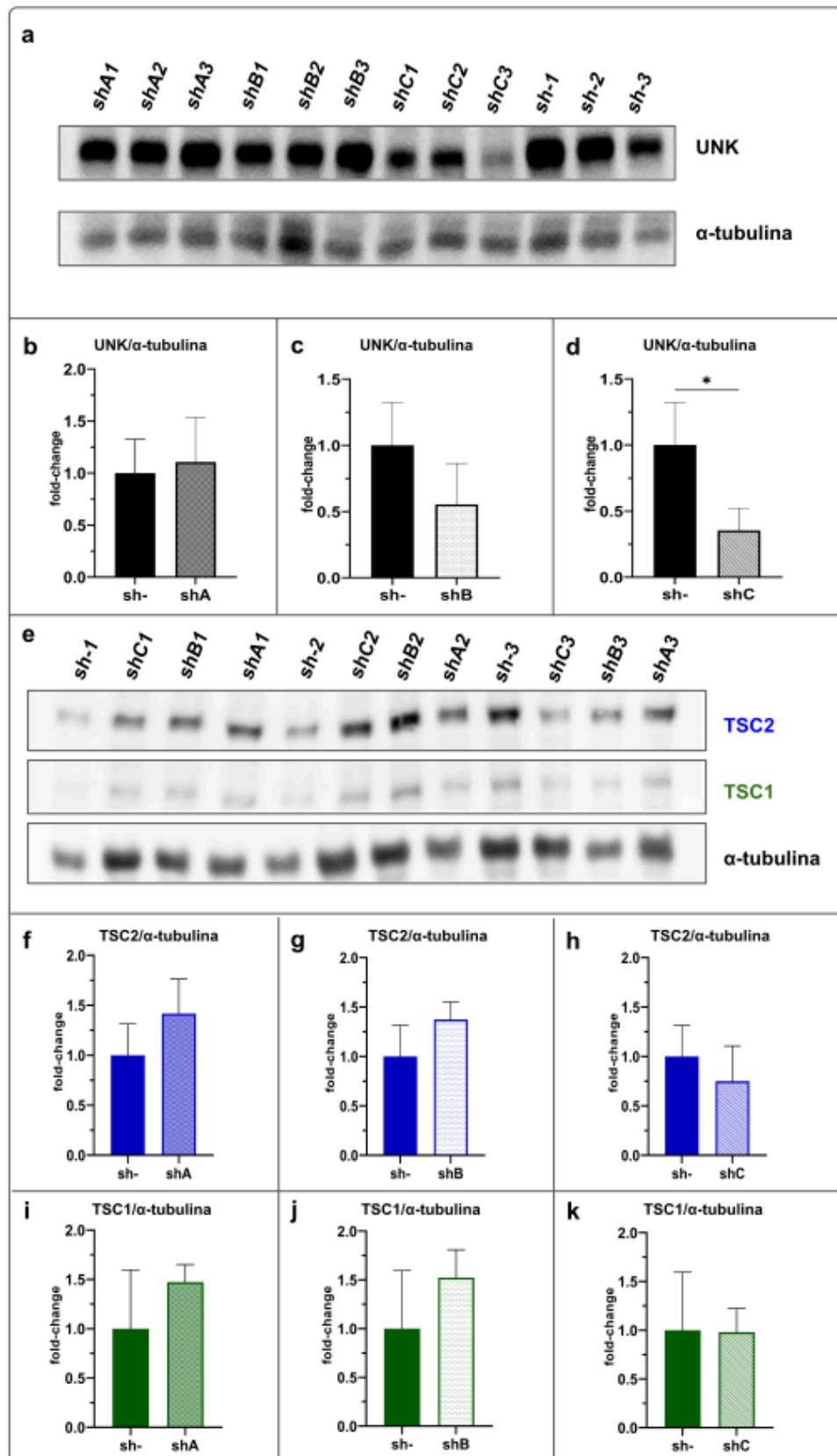


Figura 17. *Immunoblotting* de HEK293T transduzidas com plasmídeos expressando shRNA controle (sh-, *scrambled*) ou shRNA anti-UNK (shA, shB ou shC). (a) Membrana incubada com anticorpos contra as proteínas alfa-tubulina (*loading control*) e UNK. (b-d) Quantificação dos sinais de UNK

normalizados pelo sinal de alfa-tubulina de suas respectivas canaletas, teste *t-Student*, $n = 3$, $* = p = 0,038$. (e) Membrana incubada com anticorpos contra as proteínas alfa-tubulina (*loading control*) e TSC1 ou TSC2. (f-h) Quantificação dos sinais de TSC2 normalizados pelo sinal de alfa-tubulina de suas respectivas canaletas, teste *t-Student*, $n = 3$. (i-k) Quantificação dos sinais de TSC1 normalizados pelo sinal de alfa-tubulina de suas respectivas canaletas, teste *t-Student*, $n = 3$. b: $p = 0,75$; c: $p = 0,16$; d: $p = 0,038$; f: $p = 0,20$; g: $p = 0,15$; h: $p = 0,41$; i: $p = 0,26$; j: $p = 0,24$; k: $p = 0,96$.

5. Discussão

Células da linhagem HEK293T, originárias de rim embrionário, têm sido usadas para investigar a função dos alelos selvagens dos genes *TSC1* e *TSC2* sobre mTORC1, bem como sua disfunção causada por variantes patogênicas de pacientes com TSC (Almeida *et al.*, 2019; Hoogeveen-westerveld *et al.*, 2011; Nellist *et al.*, 2005; Nellist *et al.*, 2008; Wentink *et al.*, 2011). Nossos resultados de *immunoblotting* mostraram que HEK293T apresenta expressão endógena das proteínas TBC1D7 e UNK, além de TSC1 e TSC2 (Fig. 13b). Os estudos computacionais de dados transcriptômicos em que HEK293T foi submetida à repressão da via de mTORC1 por rapamicina mostraram, após 72 horas, aumento da quantidade de RNAm de *TSC2* (Fig. 10). Os dados de transcriptoma de músculo sóleo de camundongos tratados *in vivo* por 15 meses com rapamicina também revelaram aumento do RNAm de *Tsc2* (Fig. 11b). Estes dados sugerem que a quantidade de RNAm de *TSC2* seja negativamente regulada pela via de mTORC1 e são consistentes com outros dados do laboratório em que se observou a redução desse RNAm em HEK293T com nocaute completo de *TSC1* (Almeida, 2019). Um aspecto adicional foi a redução da quantidade de RNAm de *Tsc1* e *Tbc1d7* em músculo sóleo de camundongos tratados com rapamicina (Fig. 11b). Como esse efeito não foi observado em HEK293T tratada com rapamicina por 72 horas (Fig. 10), é possível que seja específico ao tecido ou espécie ou ainda um efeito a médio/longo prazo. A redução do RNAm de *TSC2* na linhagem humana SH-SY5Y que sofreu *knocking down* de UNK (Fig. 12) sugere que, se UNK tiver um efeito direto sobre a estabilidade de RNAs, este deva ser sinérgico ou coincidente ao de mTORC1 sobre o RNAm de *TSC2*.

A atividade da via de mTORC1 causa alteração na expressão de alguns genes (Artoni *et al.*, 2023; Chaveroux *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2006; Thoreen *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2010). Entre os genes cuja expressão é alterada de maneira dependente da via de mTORC1, os que contém motivos 5' TOP parecem ser mais afetados do que outros (Thoreen *et al.*, 2012). Contudo, o principal efeito dessa regulação é ao nível traducional, disponibilizando prontamente proteínas ribossomais tão logo aminoácidos tenham seus níveis aumentados após um período de carenciamento. Embora esse sistema regule o comprimento da cauda de poli-A de RNAm, esses parecem se manter em um pool estável (Ogami *et al.*, 2022; Baptissart *et al.*, 2023), o que não justificaria o aumento da quantidade de RNAm de *TSC2* quando há inatividade de mTORC1. Nenhum dos genes estudados aqui, *TSC1*, *TSC2*, *TBC1D7* ou *UNK*, apresenta o motivo 5' TOP canônico. Curiosamente, motivos considerados TOP-like foram

preditos na 5' UTR de *TSC2*, tornando-o um candidato e esse tipo de regulação (Yamashita *et al.*, 2008).

Aumento na quantidade de transcritos de *Tsc2* já foi relatado em experimentos de inibição de mTORC1 com Torina1 em fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs, do inglês *mouse embryonic fibroblasts*) (Thoreen *et al.*, 2012). Uma alternativa plausível é o gene *TSC2* ser alvo da regulação transcricional positiva por TFEB, um fator transcricional regulado positivamente por sua translocação nuclear quando mTORC1 é reprimido (Peña-Lopis *et al.*, 2011; Settembre *et al.*, 2011; Martina *et al.*, 2012; Rocznik-Ferguson *et al.*, 2012). Além da alimentação positiva à transcrição do gene *TSC2*, fatores que reprimam o decaimento do RNAm desse gene poderiam justificar o aumento da quantidade de seu RNAm quando mTORC1 é reprimido.

Até o momento não temos conhecimento de relatos na literatura da diminuição da quantidade de RNAm de *Tsc1* após inibição de mTORC1, como observado aqui no transcriptoma de músculo sóleo de camundongo tratado com rapamicina. Na literatura diversos artigos relatam a translocação de mTOR ao núcleo celular, e em um caso mTOR foi encontrado interagindo com o DNA em regiões genômicas próximas aos sítios de início da transcrição de diferentes genes, sendo *Tsc1* um deles (Chaveroux *et al.*, 2013). Se mTOR tem algum efeito na transcrição de *Tsc1* ainda é algo a ser elucidado, mas esses resultados apontam para a interessante hipótese de que mTOR poderia modular a transcrição de *TSC1* ao ser translocado ao núcleo e se ligar à região promotora do gene. Dentre os dados apresentados aqui, o RNAm de *Tsc1* só se alterou em músculo sóleo de camundongos que receberam rapamicina por 15 meses suplementada à ração. Um cenário plausível seria o de que a rapamicina aumentasse a expressão de miRNAs que tenham *TSC1* como alvo (Tabela 2).

O presente trabalho gerou uma linhagem de HEK293T geneticamente modificada, em que a proteína UNK foi significativamente reduzida (Fig. 17d). Nesta linhagem não se observou alteração da quantidade de proteínas TSC1 e TSC2 (Fig. 17h e k). Esse estudo (parte C da Seção de Resultados) tem as limitações de não ter testado alterações da quantidade de RNAm nem ter avaliado o efeito da inibição da via de mTORC1 na linhagem celular geneticamente modificada (shRNA C para *UNK*). Em linhagem HEK293T não modificada, houve aumento de UNK 24 horas após carenciamento e o tratamento consecutivo com rapamicina por mais 24 horas manteve os níveis mais elevados de UNK (Fig. 15g).

Short hairpin RNAs (shRNAs) pertencem a uma classe de moléculas sintéticas de RNA que, após serem expressas e processadas pela proteína DICER, dão origem à *short*

interfering RNAs (siRNAs) que interagem com a proteína AGO no complexo RISC e, por fim, são capazes de inibir a tradução dos transcritos alvos (Elbashir *et al.*, 2001, Hu *et al.*, 2020). O *knockdown* de genes por RNAi pode ser feito de diferentes maneiras. Entre elas, a produção de linhagens estáveis que constitutivamente expressem o shRNA que dará origem ao siRNA apresenta a melhor eficácia na diminuição da tradução dos RNAs alvos (Manjunath *et al.*, 2009; Sliva e Schnierle, 2010). Dentre os mecanismos usados para produzir tais linhagens, a transdução com partículas lentivirais contendo vetor de expressão do shRNA foi escolhida por se tratar de uma metodologia vastamente validada na literatura (Manjunath *et al.*, 2009; Sliva e Schnierle, 2010).

Células HEK293T foram transduzidas com vetores lentivirais contendo plasmídeos para expressão de três shRNAs únicos, que tinham como alvo os transcritos de UNK, além de um shRNA controle negativo. Embora a eficiência da transdução tenha sido comprovada pela expressão do gene repórter GFP, somente um dos shRNAs (shRNA C) se mostrou suficiente para a redução da proteína endógena, quando avaliado por *immunoblotting* (Fig 17b-d). A falta de alterações quantitativas nos níveis proteicos de TSC1 e TSC2 nestas linhagens, até mesmo no grupo de células com diminuição significativa de UNK, contraria a hipótese de que UNK possa regular o RNAm de *TSC1* ao nível traducional. No entanto, a expressão residual de UNK, ainda observada nas células shRNA C, pode ter sido suficiente para a manutenção da função da proteína nesta situação. Por outro lado, essa regulação pode depender da regulação da atividade de mTORC1, que não foi testada com rapamicina nessa linhagem e que deverá ser realizado.

Na literatura, um trabalho confirmou a quantidade proteica de três genes cujos RNAs sejam potencialmente regulados por UNK após *knockdown* da proteína, sendo eles: *CCT5*, *DDX5* e *HNRNPK*. Em todos os casos houve aumento da quantidade de proteína em SH-SY5Y com *knockdown* de UNK (Murn *et al.*, 2015a). Experimentos posteriores avaliando a expressão de outros candidatos à regulação por UNK ajudarão a esclarecer este cenário. Essa hipótese pode ser testada em linhagens celulares nocaute para UNK.

Embora a hipótese inicial fosse que UNK poderia controlar os níveis de TSC1 diretamente devido à presença de motivos conservados no RNAm de *TSC1*, a existência de uma relação indireta não pode ser descartada. Genes que codificam para proteínas nucleares que interagem com DNA, RNA e fatores de transcrição estão entre os transcritos candidatos a controle traducional por UNK (Murn *et al.*, 2015a). O potencial controle de UNK na tradução de transcritos desses genes pode estar relacionado às alterações na quantidade de RNAm dos

genes regulados por eles. Se esse tipo de regulação ocorre e o quanto isso pode afetar indiretamente alvos de fatores de transcrição regulados por UNK ainda precisa ser investigado. Curiosamente, a quantidade de proteína do fator de transcrição D-Pax2 aumenta quando há perda de Unk e as proteínas interagem fisicamente no olho de *Drosophila* (Avet-Rochex *et al.*, 2014). *D-Pax2* é um importante fator de transcrição para genes envolvidos no neurodesenvolvimento em *Drosophila* (Charlton-Perkins *et al.*, 2011). Recentemente foi demonstrado que a haploinsuficiência de *Tsc1* está relacionada à desregulação dos níveis de um dos ortólogos de D-Pax2 (Pax2) no cerebelo de camundongos (Serra *et al.*, 2022), região onde há alta expressão de *TSC1* e *TSC2* em humanos (Li *et al.*, 2018). A relação entre *Tsc1* e *Pax2*, bem como os possíveis desdobramentos no desenvolvimento e diferenciação celular deverão ser esclarecidos nos próximos anos. Além de efeitos indiretos, a possibilidade de que a expressão de UNK e TSC1 seja regulada por elementos em comum também explicaria a co-expressão dos genes. Para testar essa hipótese, elementos em cis como promotores, enhancers e outros sítios para fatores de transcrição em comum entre os genes devem ser buscados em suas sequências genômicas.

Experimentos em diferentes linhagens celulares humanas mostram que o fenótipo de polarização celular induzido por *UNK* parece ser pouco sensível ao tipo celular (Murn *et al.*, 2015a; Murn *et al.*, 2015b). Esse efeito está possivelmente relacionado ao controle da expressão dos potenciais transcritos-alvo de UNK, enriquecidos em genes relacionados à morfologia celular e *turnover* proteico (Murn *et al.*, 2015a), embora essa hipótese careça de demonstrações contundentes. Ainda não é conhecido o quanto a função de UNK como RBP pode ser afetada de maneira linhagem e tecido-específica. No entanto, células com características neuronais apresentam maior expressão do gene, sugerindo que sejam mais suscetíveis às perturbações dos níveis proteicos de UNK. Sabendo da importância de UNK, TSC1 e mTOR em células de origem neuronal, experimentos em linhagens como SH-SY5Y ou iPSCs (do inglês, *induced pluripotent stem cells*) diferenciadas em NPCs (do inglês, *neural progenitor cells*) devem refletir melhor os impactos das perturbações dos níveis dessas proteínas na homeostase e diferenciação celular no sistema nervoso.

Na literatura, a função reportada de UNK é ainda muito limitada e está majoritariamente relacionada ao controle traducional de seus transcritos-alvo (Murn *et al.*, 2015a; Murn *et al.*, 2015b). No entanto, proteínas ligantes de RNA (RBP) podem comumente desempenhar funções distintas dependendo de múltiplos fatores, como interações com diferentes proteínas, localização subcelular e modificações pós-traducionais. Portanto, o

possível envolvimento de UNK em processos divergentes dos até agora identificados na literatura não pode ser descartado.

A quantidade das proteínas do complexo TSC, inibidor de mTORC1, não aumentou com a inibição da via. Esse resultado vai contra a hipótese de que haja uma alça de regulação controlando os níveis proteicos nesse ponto. Diferentes tipos celulares podem reagir de maneiras distintas à ação da rapamicina. Ademais, embora baixas concentrações de rapamicina (e.g. 1-10 nM) pareçam ser suficientes para diminuir a fosforilação dos repórteres de atividade de mTORC1, i.e., 4EBP1, S6K1 e S6, sugerindo a eficiência na inibição da via, pode haver variação do efeito dependendo da concentração e tempo de tratamento, o que não foi possível averiguar neste trabalho.

Diferentemente das demais proteínas, os níveis de UNK aumentaram nas células depois do carenciamento, permanecendo elevados com o tratamento. Este resultado aponta para uma relação entre a inatividade da via e a estabilidade dos níveis proteicos de UNK. Até o momento não temos conhecimento de trabalhos demonstrando a relação inversamente proporcional entre atividade de mTORC1 e níveis proteicos de UNK com quantificação adequada. Curiosamente, a fosforilação de resíduos de UNK foi recentemente demonstrada como resultado da atividade de mTORC1 em mamíferos (Baskaran *et al.*, 2023), elucidando a natureza funcional da relação entre a via e UNK que consta em diferentes trabalhos na literatura (Avet-Rochex *et al.*, 2014; Glatter *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2019; Maierbrugger *et al.*, 2020). A fosforilação de UNK tem repercussões funcionais, levando à diminuição da capacidade da proteína em induzir a polarização celular (Baskaran *et al.*, 2023). Embora não tenha sido nosso objetivo testar a fosforilação da proteína neste trabalho, nossos *immunoblots* de UNK evidenciam um pequeno atraso no padrão de migração das bandas no grupo controle (Figura 15d). Essa diminuição da mobilidade eletroforética pode estar relacionada à fosforilação de diferentes resíduos da proteína, causando um atraso na migração e maior número de bandas no controle, onde a via de mTORC1 não está inibida. A avaliação da fosforilação da proteína deverá ser feita com anticorpos específicos para resíduos fosforilados (que ainda não estão comercialmente disponíveis) ou com o tratamento dos lisados com fosfatases, seguido de avaliação do padrão de bandas por *immunoblotting*. Juntos, esses resultados indicam a interessante possibilidade da degradação de UNK fosforilada ou desfosforilação de UNK. Experimentos posteriores que avaliem os níveis de UNK em diferentes tempos de tratamento com rapamicina e em associação a inibidores de proteassoma serão importantes para testar essa hipótese.

A quantidade de UNK pode também ter sido diminuída de maneira independente da atividade de mTORC1, uma vez que o carenciamento foi suficiente para causar o efeito total. A via do receptor de insulina, principal efetor do carenciamento, também afeta a expressão de alguns genes (Hancock *et al.*, 2019). Futuros experimentos realizando a inibição da via sem carenciamento poderão testar essa hipótese.

Em células S2 de *Drosophila*, a inibição de dTORC1 por tratamento com rapamicina induziu o aumento da quantidade de RNAm de *unk* (Guertin *et al.*, 2006). Embora relevante, esse resultado carece de replicação. Nos transcriptomas de células HEK293T e camundongos tratados com rapamicina dos projetos avaliados, detectamos alteração limítrofe na quantidade de RNAm de *UNK*, indicando que o aumento de RNAm visto após inibição de dTORC1 em *Drosophila* pode não ser conservado ou apenas ocorrer em células ou tecidos específicos.

Perspectivas

O RNAm de *TSCI* apresenta uma longa região 3' UTR, composta por 4.886 bases, sendo relativamente bem conservada (77% de identidade) em camundongos. O tamanho e conservação dessa região não codificante sugere a existência de elementos em *cis* importantes para a regulação do transcrito de *TSCI*. Os resultados de nossos experimentos com perturbação dos níveis de UNK não corroboraram a potencial relação de regulação entre UNK e o RNAm de *TSCI*. No entanto, transcritos de diferentes genes que codificam para RBPs foram encontrados co-superexpressos com o RNAm de *TSCI* em nossas análises anteriores de transcriptoma de tumores. Dentre eles, destacam-se os genes que codificam para as proteínas DND1 (do inglês, *DND microRNA-mediated repression inhibitor 1*), MSI2 (do inglês, *musashi RNA-binding protein 2*) e METTL3 (do inglês, *methyltransferase 3, N6-adenosine-methyltransferase complex catalytic subunit*). A proteína DND1 é uma RBP que promove a estabilidade de seus transcritos-alvo ao ocultar sítios reconhecidos por miRNAs que, por sua vez, desestabilizam o transcrito, promovendo sua degradação (Zhang *et al.*, 2021). A região 3' UTR de *TSCI* também apresenta motivos em potencial para DND1, sendo a proteína uma interessante candidata a sua regulação. MSI2, paróloga de MSI1, é uma RBP evolutivamente conservada envolvida nos processos de estabilidade e controle traducional de seus transcritos-alvo (Fox *et al.*, 2015). A proteína tem como alvo transcritos de genes da via de Wnt, uma via evolutivamente conservada e importante em processos de diferenciação celular, renovação de células-tronco e câncer (Liu *et al.*, 2022). Além de estar envolvida em processos semelhantes aos da via de mTORC1, Wnt atua à montante de

mTORC1, sendo um dos efetores que modulam a atividade do complexo TSC1-TSC2-TBC1D7 através de GSK3 (do inglês, *glycogen synthase kinase 3*; Inoki *et al.*, 2006). O RNAm de *TSC1* sofre metilação de adenosina na posição 6 (m6A) (Zhao *et al.*, 2024) e METTL3, junto à METTL14, são responsáveis por esse tipo de modificação pós-transcricional em diferentes transcritos (He e He, 2021). A metilação de adeninas na posição 6 é uma das maneiras mais comuns de modificação pós-transcricional de RNAs e está relacionada aos diferentes processos de transporte, degradação, estabilidade, *splicing* e tradução dos transcritos, a depender das proteínas que interajam com o RNAm marcado (He e He, 2021). Tendo isso em mente, é possível que a m6A do RNAm de *TSC1* seja mediada por METTL3, podendo impactar na estabilidade do transcrito, hipótese que deverá ser testada.

Além de sítios para as RBPs candidatas, a região 3' UTR do RNAm de *TSC1* apresenta potenciais sítios para dezenas de miRNAs (dados não mostrados). De fato, a regulação do RNAm de *TSC1* por miRNAs já foi experimentalmente demonstrada em diferentes espécies (Tabela 2), no entanto, muitos miRNAs candidatos a regular o transcrito de *TSC1* ainda precisam ser testados. Se esses miRNAs regulam de fato a expressão do gene e o quanto a interação destes com RBPs podem afetar a estabilidade do transcrito de *TSC1* será motivo de futuras investigações.

6. Conclusões

As conclusões deste trabalho foram:

1. A via de mTORC1 tem efeito negativo sobre a quantidade de RNAm de *TSC2* em HEK293T e músculo sóleo de camundongo.
2. Em HEK293T, a inatividade da via de mTORC1 aumenta o nível da proteína UNK.
3. Em linhagem celular SH-SY5Y, a redução de UNK diminui a quantidade de RNAm de *TSC2*, corroborando o efeito negativo de mTORC1 observado sobre esse RNAm.
4. Rapamicina na dieta de camundongos reduz ao longo prazo o RNAm de *Tsc1* e *Tbc1d7* em músculo sóleo.
5. A redução da proteína UNK em HEK293T não altera a quantidade das proteínas TSC1 e TSC2.

7. Referências bibliográficas

ALFAIZ, Ali Abdullah; MICALE, Lucia; MANDRIANI, Barbara; AUGELLO, Bartolomeo; PELLICO, Maria Teresa; CHRAST, Jacqueline; XENARIOS, Ioannis; ZELANTE, Leopoldo; MERLA, Giuseppe; REYMOND, Alexandre. TBC1D7 Mutations are Associated with Intellectual Disability, Macrocrania, Patellar Dislocation, and Celiac Disease. *Human Mutation*, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 447-451, 17 mar. 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22529>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.22529>. Acesso em: 25 out. 2023.

ALMEIDA, Luiz G. Mutational and functional study of Tuberous Sclerosis Complex 1 and 2 genes (TSC1 and TSC2). 182 p. Tese (Doutorado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-27082019-100610/pt-br.php>. Acesso em 05 jan. 2024.

ALMEIDA, Luiz G. Dufner; NANHOE, Santoeha; ZONTA, Andrea; HOSSEINZADEH, Mitra; KOM-GORTAT, Regina; ELFFERICH, Peter; SCHAAF, Gerben; KENTER, Annegien; KÜMMEL, Daniel; MIGONE, Nicola. Comparison of the functional and structural characteristics of rare TSC2 variants with clinical and genetic findings. *Human Mutation*, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 759-773, 19 dez. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.23963>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7154745/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ARTONI, Filippo; GRÜTZMACHER, Nina; DEMETRIADES, Constantinos. Unbiased evaluation of rapamycin's specificity as an mTOR inhibitor. *Aging Cell*, [S.L.], v. 22, n. 8, 24 maio 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ace.13888>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10410055/>. Acesso em: 25 out. 2023.

AVET-ROCHEX, Amélie; CARVAJAL, Nancy; CHRISTOFOROU, Christina P.; YEUNG, Kelvin; MAIERBRUGGER, Katja T.; HOBBS, Carl; LALLI, Giovanna; CAGIN, Umut; PLACHOT, Cedric; MCNEILL, Helen. Unkempt Is Negatively Regulated by mTOR and Uncouples Neuronal Differentiation from Growth Control. *Plos Genetics*, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1004624-1004624, 11 set. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004624>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1004624>. Acesso em: 17 nov. 2020.

BACHMANN, Rebecca A.; KIM, Jeong-Ho; WU, Ai-Luen; PARK, In-Hyun; CHEN, Jie. A Nuclear Transport Signal in Mammalian Target of Rapamycin Is Critical for Its Cytoplasmic Signaling to S6 Kinase 1. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 281, n. 11, p. 7357-7363, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m512218200>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)35358-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)35358-X/fulltext). Acesso em: 25 out. 2023.

BAPTISSART, Marine; PAPAS, Brian N.; CHI, Ru-Pin Alicia; LI, Yin; LEE, Dongwon; PUVIINDRAN, Bhairavy; MORGAN, Marcos. A unique poly(A) tail profile uncovers the stability and translational activation of TOP transcripts during neuronal differentiation. *Iscience*, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 107511, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2023.107511>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37636056/>. Acesso em: 25 out. 2023.

BASKARAN, Pranetha; MIHAYLOV, Simeon R.; VINSLAND, Elin; SHAH, Kriti; GRANAT, Lucy; ULTANIR, Sila K.; TEE, Andrew R.; MURN, Jernej; BATEMAN, Joseph M.. Phosphorylation of the novel mTOR substrate Unkempt regulates cellular morphogenesis. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 299, n. 1, p. 102788, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102788>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(22\)01231-5/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(22)01231-5/fulltext). Acesso em: 25 out. 2023.

BENJAMIN, Don; COLOMBI, Marco; MORONI, Christoph; HALL, Michael N.. Rapamycin passes the torch: a new generation of mtor inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, [S.L.], v. 10, n. 11, p. 868-880, 31 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3531>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd3531>. Acesso em: 25 out. 2023.

BENVENUTO, Giovanna; LI, Shaowei; BROWN, Samantha J; BRAVERMAN, Richard; VASS, William C; CHEADLE, Jeremy P; HALLEY, Dicky J; SAMPSON, Julian R; WIENECKE, Ralf; DECLUE, Jeffrey e. The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene*, [S.L.], v. 19, n. 54, p. 6306-6316, 14 dez. 2000. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1204009>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1204009>. Acesso em: 25 out. 2023.

BIERER, B e; MATTILA, P s; STANDAERT, R F; A HERZENBERG, L; BURAKOFF, S J; CRABTREE, G; SCHREIBER, S L. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 87, n. 23, p. 9231-9235, dez. 1990. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.23.9231>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55138/>. Acesso em: 25 out. 2023.

BROWN, Eric J.; ALBERS, Mark W.; SHIN, Tae Bum; ICHIKAWA, Kazuo; KEITH, Curtis T.; LANE, William S.; SCHREIBER, Stuart L.. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, [S.L.], v. 369, n. 6483, p. 756-758, jun. 1994. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/369756a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/369756a0>. Acesso em: 25 out. 2023.

BURNS, J C; FRIEDMANN, T; DRIEVER, W; BURRASCANO, M; YEE, J K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 90, n. 17, p. 8033-8037, set. 1993. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.17.8033>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47282/>. Acesso em: 25 out. 2023.

CAPO-CHICHI, José-Mario; TCHERKEZIAN, Joseph; HAMDAN, Fadi F; DÉCARIE, Jean Claude; DOBRZENIECKA, Sylvia; PATRY, Lysanne; NADON, Marc-Antoine; MUCHA, Bettina e; MAJOR, Philippe; SHEVELL, Michael. Disruption of TBC1D7, a subunit of the TSC1-TSC2 protein complex, in intellectual disability and megalencephaly. *Journal Of Medical Genetics*, [S.L.], v. 50, n. 11, p. 740-744, 17 maio 2013. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101680>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23687350/>. Acesso em: 25 out. 2023.

CHAUVEROUX, Cédric; EICHNER, Lillian J.; DUFOUR, Catherine R.; SHATNAWI, Aymen; KHOUTORSKY, Arkady; BOURQUE, Guillaume; SONENBERG, Nahum; GIGUÈRE, Vincent. Molecular and Genetic Crosstalks between mTOR and ER α Are Key Determinants of Rapamycin-Induced Nonalcoholic Fatty Liver. *Cell Metabolism*, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 586-598, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.003>. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(13\)00106-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS155041311300106X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(13)00106-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS155041311300106X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

CHARLTON-PERKINS, Mark; WHITAKER, S Leigh; FEI, Yueyang; XIE, Baotong; LI-KROEGER, David; GEBELEIN, Brian; COOK, Tiffany. Prospero and Pax2 combinatorially control neural cell fate decisions by modulating Ras- and Notch-dependent signaling. *Neural Development*, [S.L.], v. 6, n. 1, 3 maio 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1749-8104-6-20>. Disponível em: <https://neuraldevelopment.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-8104-6-20>. Acesso em: 25 out. 2023.

CHEAH, Pike-See; PRABHAKAR, Shilpa; YELLEN, David; BEAUCHAMP, Roberta L.; ZHANG, Xuan; KASAMATSU, Shingo; BRONSON, Roderick T.; THIELE, Elizabeth A.; KWIATKOWSKI, David J.; STEMMER-RACHAMIMOV, Anat. Gene therapy for tuberous sclerosis complex type 2 in a mouse model by delivery of AAV9 encoding a condensed form of tuberin. *Science Advances*, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 1703, jan. 2021. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abb1703>. Disponível em: <https://advances.sciencemag.org/content/7/2/eabb1703>. Acesso em: 03 maio 2021.

CHEN, Qingyong; HU, Huizhen; JIAO, Demin; YAN, Jie; XU, Wei; TANG, Xiali; CHEN, Jun; WANG, Jian. MiR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: the underlying molecular mechanisms. *Oncology Reports*, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 909-917, 3 jun. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2016.4854>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27277197/>. Acesso em: 25 out. 2023.

CHUNG, Jongkyeong; KUO, Calvin J.; CRABTREE, Gerald R.; BLENIS, John. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*, [S.L.], v. 69, n. 7, p. 1227-1236, jun. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90643-q](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(92)90643-q). Disponível em: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(92\)90643-Q.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749290643Q%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(92)90643-Q.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749290643Q%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

CLOUGH, Emily; BARRETT, Tanya. The Gene Expression Omnibus Database. *Methods In Molecular Biology*, [S.L.], p. 93-110, 2016. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4944384/>. Acesso em: 25 out. 2023.

COCKMAN, Eric; ANDERSON, Paul; IVANOV, Pavel. TOP mRNPs: molecular mechanisms and principles of regulation. *Biomolecules*, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 969, 27 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom10070969>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407576/>. Acesso em: 25 out. 2023.

DIBBLE, Christian C.; ELIS, Winfried; MENON, Suchithra; QIN, Wei; KLEKOTA, Justin; ASARA, John M.; FINAN, Peter M.; KWIATKOWSKI, David J.; MURPHY, Leon O.; MANNING, Brendan D.. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 535-546, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.009>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3693578/>. Acesso em: 25 out. 2023.

DOMINGUEZ, Daniel; FREESE, Peter; ALEXIS, Maria S.; SU, Amanda; HOCHMAN, Myles; PALDEN, Tsultrim; BAZILE, Cassandra; LAMBERT, Nicole J.; VAN NOSTRAND, Eric L.; PRATT, Gabriel A.. Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Molecular Cell*, [S.L.], v. 70, n. 5, p. 854-867, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358403/>. Acesso em: 25 out. 2023.

DUBRIDGE, R B; TANG, P; HSIA, H C; LEONG, P M; MILLER, J H; CALOS, M P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular And Cellular Biology*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 379-387, jan. 1987. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.7.1.379>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC365079/>. Acesso em: 25 out. 2023.

DULL, Tom; ZUFFEREY, Romain; KELLY, Michael; MANDEL, R. J.; NGUYEN, Minh; TRONO, Didier; NALDINI, Luigi. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 72, n. 11, p. 8463-8471, 1 nov. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.11.8463-8471.1998>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110254/>. Acesso em: 25 out. 2023.

DÜVEL, Katrin; YECIES, Jessica L.; MENON, Suchithra; RAMAN, Pichai; LIPOVSKY, Alex I.; SOUZA, Amanda L.; TRIANTAFELLOW, Ellen; MA, Qicheng; GORSKI, Regina; CLEAVER, Stephen. Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of mTOR Complex 1. *Molecular Cell*, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 171-183, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2946786/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ELBASHIR, Sayda M.; HARBORTH, Jens; LENDECKEL, Winfried; YALCIN, Abdullah; WEBER, Klaus; TUSCHL, Thomas. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, [S.L.], v. 411, n. 6836, p. 494-498, maio 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11373684/>. Acesso em: 25 out. 2023.

FOX, Raymond G.; PARK, Frederick D.; KOECHLEIN, Claire S.; KRITZIK, Marcie; REYA, Tannishtha. Musashi Signaling in Stem Cells and Cancer. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 249-267, 13 nov. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125446>. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-100814-125446>. Acesso em: 25 out. 2023.

GAI, Zhongchao; CHU, Wendan; DENG, Wei; LI, Wenqi; LI, Hua; HE, Ailiang; NELLIST, Mark; WU, Geng. Structure of the TBC1D7–TSC1 complex reveals that TBC1D7 stabilizes dimerization of the TSC1 C-terminal coiled coil region. *Journal Of Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 411-425, 21 jan. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jmcb/mjw001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26798146/>. Acesso em: 25 out. 2023.

GLATTER, Timo; SCHITTENHELM, Ralf B; RINNER, Oliver; ROGUSKA, Katarzyna; WEPF, Alexander; A JÜNGER, Martin; KÖHLER, Katja; JEVTOV, Irena; CHOI, Hyungwon; SCHMIDT, Alexander. Modularity and hormone sensitivity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor/target of rapamycin interaction proteome. *Molecular Systems Biology*, [S.L.], v. 7, n. 1, jan. 2011. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.79>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261712/>. Acesso em: 25 out. 2023.

GRAHAM, F. L.; RUSSELL, W. C.; SMILEY, J.; NAIRN, R.. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *Journal Of General Virology*, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 59-72, 1 jul. 1977. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-36-1-59#tab2>. Acesso em: 25 out. 2023.

GÓMEZ, Manuel Rodríguez. History of the tuberous sclerosis complex. *Brain And Development*, [S.L.], v. 17, p. 55-57, jan. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0387-7604\(94\)00130-8](http://dx.doi.org/10.1016/0387-7604(94)00130-8). Disponível em: [https://www.brainanddevelopment.com/article/0387-7604\(94\)00130-8/pdf](https://www.brainanddevelopment.com/article/0387-7604(94)00130-8/pdf). Acesso em: 25 out. 2023.

HAM, Daniel J.; BÖRSCH, Anastasiya; LIN, Shuo; THÜRKAUF, Marco; WEIHRAUCH, Martin; REINHARD, Judith R.; DELEZIE, Julien; BATTILANA, Fabienne; WANG, Xueyong; KAISER, Marco S.. The neuromuscular junction is a focal point of mTORC1 signaling in sarcopenia. *Nature Communications*, [S.L.], v. 11, n. 1, 9 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18140-1>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7481251/>. Acesso em: 25 out. 2023.

HANCOCK, Melissa L.; MEYER, Rebecca C.; MISTRY, Meeta; KHETANI, Radhika S.; WAGSCHAL, Alexandre; SHIN, Taehwan; SUI, Shannan J. Ho; NÄÄR, Anders M.; FLANAGAN, John G.. Insulin Receptor Associates with Promoters Genome-wide and Regulates Gene Expression. *Cell*, [S.L.], v. 177, n. 3, p. 722-736,

abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.030>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478446/>. Acesso em: 25 out. 2023.

HAY, Nissim; SONENBERG, Nahum. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, [S.L.], v. 18, n. 16, p. 1926-1945, 15 ago. 2004. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1212704>. Disponível em: <https://genesdev.cshlp.org/content/18/16/1926.long>. Acesso em: 25 out. 2023.

HE, P Cody; HE, Chuan. M 6 A RNA methylation: from mechanisms to therapeutic potential. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 40, n. 3, 20 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.15252/embj.2020105977>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7849164/>. Acesso em: 25 out. 2023.

HENSKE, Elizabeth P.; JÓŰWIĄK, Sergiusz; KINGSWOOD, J. Christopher; SAMPSON, Julian R.; THIELE, Elizabeth A.. Tuberous sclerosis complex. *Nature Reviews Disease Primers*, [S.L.], v. 2, n. 1, 26 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.35>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201635>. Acesso em: 25 out. 2023.

HOOGEVEEN-WESTERVELD, Marianne; WENTINK, Marjolein; HEUVEL, Diana van Den; MOZAFFARI, Melika; EKONG, Rosemary; POVEY, Sue; DUNNEN, Johan T. Den; METCALFE, Kay; VALLEE, Stephanie; KRUEGER, Stefan. Functional assessment of variants in the TSC1 and TSC2 genes identified in individuals with Tuberous Sclerosis Complex. *Human Mutation*, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 424-435, 8 mar. 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21451>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.21451>. Acesso em: 25 out. 2023.

HU, Bo; ZHONG, Liping; WENG, Yuhua; PENG, Ling; HUANG, Yuanyu; ZHAO, Yongxiang; LIANG, Xing-Jie. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 5, n. 1, 19 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-0207-x>. Acesso em: 25 out. 2023.

HUANG, Jingxiang; MANNING, Brendan D.. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochemical Journal*, [S.L.], v. 412, n. 2, p. 179-190, 14 maio 2008. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20080281>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735030/>. Acesso em: 25 out. 2023.

HUTTENLOCHER, Peter R.; WOLLMANN, Robert L.. Cellular Neuropathology of Tuberous Sclerosis. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 615, n. 1, p. 140-148, abr. 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1991.tb37756.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2039139/>. Acesso em: 25 out. 2023.

INOKI, Ken; ZHU, Tianqing; GUAN, Kun-Liang. TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*, [S.L.], v. 115, n. 5, p. 577-590, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00929-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2). Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(03\)00929-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403009292%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(03)00929-2?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867403009292%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

INOKI, Ken; OUYANG, Hongjiao; ZHU, Tianqing; LINDVALL, Charlotta; WANG, Yian; ZHANG, Xiaojie; YANG, Qian; BENNETT, Christina; HARADA, Yuko; STANKUNAS, Kryn. TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell*, [S.L.], v. 126, n. 5, p. 955-968, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>. Disponível em:

[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(06\)01016-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867406010166%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(06)01016-6?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867406010166%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

JUMPER, John; EVANS, Richard; PRITZEL, Alexander; GREEN, Tim; FIGURNOV, Michael; RONNEBERGER, Olaf; TUNYASUVUNAKOOL, Kathryn; BATES, Russ; ŠÍDEK, Augustin; POTAPENKO, Anna. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, [S.L.], v. 596, n. 7873, p. 583-589, 15 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>. Acesso em: 25 out. 2023.

KIM, Jae Eun; CHEN, Jie. Cytoplasmic–nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 97, n. 26, p. 14340-14345, 12 dez. 2000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.011511898>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18920/>. Acesso em: 25 out. 2023.

KIM, Joungmok; YANG, Goowon; KIM, Yeji; KIM, Jin; HA, Joohun. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, [S.L.], v. 48, n. 4, p. 224-224, 1 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2016.16>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/emm201616>. Acesso em: 25 out. 2023.

KNUDSON, Alfred G.. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 68, n. 4, p. 820-823, abr. 1971. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5279523/>. Acesso em: 25 out. 2023.

KULABEROGLU, Yavuz; MALIK, Yasir; BORLAND, Gillian; SELMAN, Colin; ALIC, Nazif; TULLET, Jennifer M. A.. RNA Polymerase III, Ageing and Longevity. *Frontiers In Genetics*, [S.L.], v. 12, 6 jul. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2021.705122>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.705122/full>. Acesso em: 25 out. 2023.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M.. MTOR signaling at a glance. *Journal Of Cell Science*, [S.L.], v. 122, n. 20, p. 3589-3594, 7 out. 2009. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.051011>. Disponível em: <https://jcs.biologists.org/content/122/20/3589>. Acesso em: 21 ago. 2020.

LEVIS, Robert; HAZELRIGG, Tulle; RUBIN, Gerald M.. Effects of Genomic Position on the Expression of Transduced Copies of the white Gene of *Drosophila*. *Science*, [S.L.], v. 229, n. 4713, p. 558-561, 9 ago. 1985. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2992080>. Disponível em: https://www.science.org/doi/10.1126/science.2992080?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 25 out. 2023.

LI, Hong; TSANG, Chi Kwan; WATKINS, Marcus; BERTRAM, Paula G.; ZHENG, X. F. Steven. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature*, [S.L.], v. 442, n. 7106, p. 1058-1061, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05020>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature05020>. Acesso em: 25 out. 2023.

LI, Naren; LIU, Qinfang; XIONG, Yulan; YU, Jianzhong. Headcase and Unkempt Regulate Tissue Growth and Cell Cycle Progression in Response to Nutrient Restriction. *Cell Reports*, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 733-747, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.086>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124718320461>. Acesso em: 07 dez. 2020.

LI, Yi; BARKOVICH, Matthew J.; KARCH, Celeste M.; NILLO, Ryan M.; FAN, Chun-Chieh; BROCE, Iris J.; TAN, Chin Hong; CUNEO, Daniel; HESS, Christopher P.; DILLON, William P.. Regionally specific TSC1 and TSC2 gene expression in tuberous sclerosis complex. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 8, n. 1, set. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-31075-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6127129/>. Acesso em: 25 out. 2023.

LIPTON, Jonathan O.; SAHIN, Mustafa. The Neurology of mTOR. *Neuron*, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 275-291, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.09.034>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223653/>. Acesso em: 21 ago. 2020.

LIU, Grace Y.; SABATINI, David M.. MTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 183-203, 14 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102936/>. Acesso em: 25 out. 2023.

LIU, Jiaqi; XIAO, Qing; XIAO, Jiani; NIU, Chenxi; LI, Yuanyuan; ZHANG, Xiaojun; ZHOU, Zhengwei; SHU, Guang; YIN, Gang. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-1, 3 jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00762-6>. Acesso em: 25 out. 2023.

LORÈS, Patrick; VISVIKIS, Orane; LUNA, Rosa, LEMICHEZ, Emmanuel; GACON, Gérard. The SWI/SNF protein BAF60b is ubiquitinated through a signalling process involving Rac GTPase and the RING finger protein Unkempt. *The FEBS Journal*, 277: 1453-1464, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07575.x>. Acesso em: 25 out. 2023.

LYNHAM, Jeffrey; HOURY, Walid A.. The Role of Hsp90-R2TP in Macromolecular Complex Assembly and Stabilization. *Biomolecules*, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1045, 28 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom12081045>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9406135/>. Acesso em: 25 out. 2023.

MAIERBRUGGER, Katja T.; SOUSA-NUNES, Rita; BATEMAN, Joseph M.. The mTOR pathway component Unkempt regulates neural stem cell and neural progenitor cell cycle in the Drosophila central nervous system. *Developmental Biology*, [S.L.], v. 461, n. 1, p. 55-65, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.01.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001216061930418X?via%3Dihub>. Acesso em: 23 maio 2021.

MALLELA, Karthik; SHIVANANDA, Swamy; GOPINATH, Kodaganur S.; KUMAR, Arun. Oncogenic role of MiR-130a in oral squamous cell carcinoma. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-1, 8 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-87388-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-87388-4>. Acesso em: 25 out. 2023.

MANJUNATH, N.; WU, Haoquan; SUBRAMANYA, Sandesh; SHANKAR, Premlata. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, [S.L.], v. 61, n. 9, p. 732-745, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.004>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789654/>. Acesso em: 25 out. 2023.

MARTIN, Elizabeth C; RHODES, Lyndsay V; ELLIOTT, Steven; KREBS, Adrienne e; NEPHEW, Kenneth P; FLEMINGTON, Erik K; COLLINS-BUROW, Bridgette M; BUROW, Matthew e. MicroRNA regulation of

mammalian target of rapamycin expression and activity controls estrogen receptor function and RAD001 sensitivity. *Molecular Cancer*, [S.L.], v. 13, n. 1. 6 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-13-229>. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-13-229>. Acesso em: 25 out. 2023.

MARTINA, Jose A.; CHEN, Yong; GUCEK, Marjan; PUERTOLLANO, Rosa. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy*, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 903-914, 23 jun. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.19653>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427256/>. Acesso em: 06 jan. 2024.

MARTINEZ-NUNEZ, Rocio T.; WALLACE, Andrew; COYNE, Doyle; JANSSON, Linnea; RUSH, Miles; ENNAJDAOUI, Hanane; KATZMAN, Sol; BAILEY, Joanne; DEINHARDT, Katrin; SANCHEZ-ELSNER, Tilman. Modulation of nonsense mediated decay by rapamycin. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 45, n. 6, p. 3448-3459, 29 nov. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw1109>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389481/>. Acesso em: 25 out. 2023.

MICHELS, Annemieke A.; ROBITAILLE, Aaron M.; BUCZYNSKI-RUCHONNET, Diane; HODROJ, Wassim; REINA, Jaime H.; HALL, Michael N.; HERNANDEZ, Nouria. MTORC1 Directly Phosphorylates and Regulates Human MAF1. *Molecular And Cellular Biology*, [S.L.], v. 30, n. 15, p. 3749-3757, 1 ago. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.00319-10>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916396/>. Acesso em: 25 out. 2023.

MOHLER, J; WEISS, N; MURLI, S; MOHAMMADI, S; VANI, K; VASILAKIS, G; SONG, C H; A EPSTEIN,; KUANG, T; ENGLISH, J. The embryonically active gene, unkempt, of *Drosophila* encodes a Cys3His finger protein. *Genetics*, [S.L.], v. 131, n. 2, p. 377-388, 1 jun. 1992. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/131.2.377>. Disponível em: <https://academic.oup.com/genetics/article/131/2/377/6007324>. Acesso em: 25 out. 2023.

MURN, Jernej; ZARNACK, Kathi; YANG, Yawei J.; DURAK, Omer; MURPHY, Elisabeth A.; CHELOUFI, Sihem; GONZALEZ, Dilenny M.; TEPLOVA, Marianna; CURK, Tomaž; ZUBER, Johannes. Control of a neuronal morphology program by an RNA-binding zinc finger protein, Unkempt. *Genes & Development*, [S.L.], v. 29, n. 5, p. 501-512, 1 mar. 2015a. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.258483.115>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25737280/>. Acesso em: 15 ago. 2020.

MURN, Jernej; TEPLOVA, Marianna; ZARNACK, Kathi; SHI, Yang; PATEL, Dinshaw J. Recognition of distinct RNA motifs by the clustered CCCH zinc fingers of neuronal protein Unkempt. *Nature Structural & Molecular Biology*, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 16-23, 7 dez. 2015b. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3140>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsmb.3140>. Acesso em: 25 out. 2023.

NATARAJAN, Nalini; SHAIK, Althaf; THIRUVENKATAM, Vijay. Recombinant Tumor Suppressor TSC1 Differentially Interacts with *Escherichia coli* DnaK and Human HSP70. *Acs Omega*, [S.L.], v. 5, n. 30, p. 19131-19139, 24 jul. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c02480>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32775915/>. Acesso em: 25 out. 2023.

NELLIST, Mark, VAN SLEGTHENHORST, Marjon, GOEDBLOED, Miriam, VAN DEN OUWELAND, Ans, HALLEY, Dicky, & VAN DER SLUIJS, Peter. Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex. Tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 35647-35652, 10 dez. 1999. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)53294-X/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)53294-X/fulltext). Acesso em: 07 maio 2021

NELLIST, Mark; BURGERS, Peter C.; OUWELAND, Ans M.W. van Den; HALLEY, Dicky J.J.; LUIDER, Theo M.. Phosphorylation and binding partner analysis of the TSC1–TSC2 complex. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 333, n. 3, p. 818-826, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.175>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X05011885>. Acesso em: 25 out. 2023.

NELLIST, Mark; SANCAK, Özgür; GOEDBLOED, Miriam; ADRIAANS, Alwin; WESSELS, Marja; MAAT-KIEVIT, Anneke; BAARS, Marieke; DOMMERING, Charlotte; OUWELAND, Ans van Den; HALLEY, Dicky. Functional characterisation of the TSC1–TSC2 complex to assess multiple TSC2 variants identified in single families affected by tuberous sclerosis complex. *Bmc Medical Genetics*, [S.L.], v. 9, n. 1, 26 fev. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2350-9-10>. Disponível em: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-9-10>. Acesso em: 25 out. 2023.

NELLIST, Mark; BROUWER, Rutger Ww; KOCKX, Christel em; VAN VEGHEL-PLANDSOEN, Monique; WITHAGEN-HERMANS, Caroline; PRINS-BAKKER, Lida; HOOGEVEEN-WESTERVELD, Marianne; MRSIC, Alan; BERG, Mike Mp van Den; KOOPMANS, Anna e. Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations. *Bmc Medical Genetics*, [S.L.], v. 16, n. 1, 25 fev. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12881-015-0155-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422413/>. Acesso em: 25 out. 2023.

NORTHRUP, H; WHELESS, J W; BERTIN, T K; A LEWIS, R. Variability of expression in tuberous sclerosis. *Journal Of Medical Genetics*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 41-43, 1 jan. 1993. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.30.1.41>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1016232/>. Acesso em: 07 maio 2021.

NORTHRUP, Hope; KRUEGER, Darcy A.; ROBERDS, Steven; SMITH, Katie; SAMPSON, Julian; KORF, Bruce; KWIATKOWSKI, David J.; MOWAT, David. Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference. *Pediatric Neurology*, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 243-254, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2013.08.001>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4080684/>. Acesso em: 25 out. 2023.

NORTHRUP, Hope; ARONOW, Mary E.; BEBIN, E. Martina; BISSLER, John; DARLING, Thomas N.; VRIES, Petrus J. de; FROST, Michael D.; FUCHS, Zoë; GOSNELL, Elizabeth S.; GUPTA, Nishant. Updated International Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria and Surveillance and Management Recommendations. *Pediatric Neurology*, [S.L.], v. 123, p. 50-66, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.07.011>. Disponível em: [https://www.pedneur.com/article/S0887-8994\(21\)00151-X/fulltext](https://www.pedneur.com/article/S0887-8994(21)00151-X/fulltext). Acesso em: 25 out. 2023.

OGAMI, Koichi; OISHI, Yuka; SAKAMOTO, Kentaro; OKUMURA, Mayu; YAMAGISHI, Ryota; INOUE, Takumi; HIBINO, Masaya; NOGIMORI, Takuto; YAMAGUCHI, Natsumi; FURUTACHI, Kazuya. MTOR- and LARP1-dependent regulation of TOP mRNA poly(A) tail and ribosome loading. *Cell Reports*, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 111548, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111548>. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(22\)01404-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124722014048%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(22)01404-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2211124722014048%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

O'LEARY, Nuala A.; WRIGHT, Mathew W.; BRISTER, J. Rodney; CIUFO, Stacy; HADDAD, Diana; MCVEIGH, Rich; RAJPUT, Bhanu; ROBBERTSE, Barbara; SMITH-WHITE, Brian; AKO-ADJEI, Danso. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 733-745, 8 nov. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1189>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4702849/>. Acesso em: 06 jan. 2024.

PEÑA-LLOPIS, Samuel; VEGA-RUBIN-DE-CELIS, Silvia; SCHWARTZ, Jacob C; WOLFF, Nicholas C; TRAN, Tram Anh T; ZOU, Lihua; XIE, Xian-Jin; COREY, David R; BRUGAROLAS, James. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 30, n. 16, p. 3242-3258, 29 jul. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.257>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160667/>. Acesso em: 06 jan. 2024.

PHILIPPE, Lucas; VASSEUR, Jean-Jacques; DEBART, Françoise; THOREEN, Carson C. La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 1457-1469, 13 dez. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx1237>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407576/>. Acesso em: 25 out. 2023.

PRABHAKAR, Shilpa; ZHANG, Xuan; GOTO, June; HAN, Sangyeul; LAI, Charles; BRONSON, Roderick; SENA-ESTEVEZ, Miguel; RAMESH, Vijaya; STEMMER-RACHAMIMOV, Anat; KWIATKOWSKI, David J.. Survival benefit and phenotypic improvement by hamartin gene therapy in a tuberous sclerosis mouse brain model. *Neurobiology Of Disease*, [S.L.], v. 82, p. 22-31, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.04.018>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5070799/>. Acesso em: 21 maio 2021.

PRABHAKAR, Shilpa; CHEAH, Pike See; ZHANG, Xuan; ZINTER, Max; GIANATASIO, Maria; HUDRY, Eloise; BRONSON, Roderick T.; KWIATKOWSKI, David J.; STEMMER-RACHAMIMOV, Anat; MAGUIRE, Casey A.. Long-Term Therapeutic Efficacy of Intravenous AAV-Mediated Hamartin Replacement in Mouse Model of Tuberous Sclerosis Type 1. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, [S.L.], v. 15, p. 18-26, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2019.08.003>. Disponível em: [https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501\(19\)30083-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS232905011930083X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/molecular-therapy-family/methods/fulltext/S2329-0501(19)30083-X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS232905011930083X%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 03 maio 2021.

PORTOCARRERO, Larissa Karine Leite; QUENTAL, Klícia Novais; SAMORANO, Luciana Paula; OLIVEIRA, Zilda Najjar Prado de; RIVITTI-MACHADO, Maria Cecília da Matta. Tuberous sclerosis complex: review based on new diagnostic criteria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [S.L.], v. 93, n. 3, p. 323-331, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20186972>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962018000300323&lng=en&tlng=en. Acesso em: 15 ago. 2020.

REVILLA-LÓPEZ, Eva; BERASTEGUI, Cristina; MÉNDEZ, Alejandra; SÁEZ-GIMÉNEZ, Berta; MIGUEL, Victoria Ruiz de; LÓPEZ-MESEGUER, Manuel; MONFORTE, Victor; BRAVO, Carlos; PUJANA, Miguel Angel; RAMON, Maria Antonia. Long-term results of sirolimus treatment in lymphangioleiomyomatosis: a single referral centre experience. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 11, n. 1, 13 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89562-0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-89562-0>. Acesso em: 25 out. 2023.

RIQUELME, Ismael; TAPIA, Oscar; LEAL, Pamela; SANDOVAL, Alejandra; VARGA, Matthew G.; LETELIER, Pablo; BUCHEGGER, Kurt; BIZAMA, Carolina; ESPINOZA, Jaime A.; PEEK, Richard M.. MiR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cellular Oncology*, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 23-33, 12 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13402-015-0247-3>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26458815/>. Acesso em: 25 out. 2023.

RIO, Donald C.; CLARK, Scott G.; TJIAN, Robert. A Mammalian Host-Vector System That Regulates Expression and Amplification of Transfected Genes by Temperature Induction. *Science*, [S.L.], v. 227, n. 4682,

p. 23-28, 4 jan. 1985. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.2981116>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2981116/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ROCZNIAK-FERGUSON, Agnes; PETIT, Constance S.; FROEHLICH, Florian; QIAN, Sharon; KY, Jennifer; ANGAROLA, Brittany; WALTHER, Tobias C.; FERGUSON, Shawn M.. The Transcription Factor TFEB Links mTORC1 Signaling to Transcriptional Control of Lysosome Homeostasis. *Science Signaling*, [S.L.], v. 5, n. 228, 12 jun. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2002790>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3437338/>. Acesso em: 06 jan. 2024.

ROMAKER, Daniel; KUMAR, Vikash; CERQUEIRA, Débora M.; COX, Ryan M.; WESSELY, Oliver. MicroRNAs are critical regulators of tuberous sclerosis complex and mTORC1 activity in the size control of the *Xenopus* kidney. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 111, n. 17, p. 6335-6340, 14 abr. 2014. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1320577111>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036005/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ROSSET, Clévia; NETTO, Cristina Brinckmann Oliveira; ASHTON-PROLLA, Patricia. TSC1 and TSC2 gene mutations and their implications for treatment in Tuberous Sclerosis Complex: a review. *Genetics And Molecular Biology*, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 69-79, 20 fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2015-0321>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47572017000100069&script=sci_arttext. Acesso em: 15 ago. 2020.

RUVINSKY, Igor; SHARON, Nitzan; LERER, Tal; COHEN, Hannah; STOLOVICH-RAIN, Miri; NIR, Tomer; DOR, Yuval; ZISMAN, Philip; MEYUHAS, Oded. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, [S.L.], v. 19, n. 18, p. 2199-2211, 15 set. 2005. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.351605>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16166381/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SABATINI, David M.; ERDJUMENT-BROMAGE, Hediye; LUI, Mary; TEMPST, Paul; SNYDER, Solomon H.. RAFT1: a mammalian protein that binds to fbp12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast tors. *Cell*, [S.L.], v. 78, n. 1, p. 35-43, jul. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90570-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90570-3). Disponível em: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(94\)90570-3.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494905703%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(94)90570-3.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867494905703%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 25 out. 2023.

SABERS, Candace J.; MARTIN, Mary M.; BRUNN, Gregory J.; WILLIAMS, Josie M.; DUMONT, Francis J.; WIEDERRECHT, Gregory; ABRAHAM, Robert T.. Isolation of a Protein Target of the FKBP12-Rapamycin Complex in Mammalian Cells. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 270, n. 2, p. 815-822, jan. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.2.815>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)83076-9/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)83076-9/fulltext). Acesso em: 25 out. 2023.

SANCHEZ-MEJIAS, Avencia; KWON, Junsu; CHEW, Xiao Hong; SIEMENS, Angela; SOHN, Hye Seon; JING, Guo; ZHANG, Bin; YANG, Henry; TAY, Yvonne. A novel SOCS5/miR-18/miR-25 axis promotes tumorigenesis in liver cancer. *International Journal Of Cancer*, [S.L.], v. 144, n. 2, p. 311-321, 9 nov. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31857>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30191950/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SCHUBERT-BAST, Susanne; STRZELCZYK, Adam. Review of the treatment options for epilepsy in tuberous sclerosis complex: towards precision medicine. *Therapeutic Advances In Neurological Disorders*, [S.L.], v. 14, p. 175628642110311, jan. 2021. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/17562864211031100>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8290505/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SEHNAL, David; BITTRICH, Sebastian; DESHPANDE, Mandar; SVOBODOVÁ, Radka; BERKA, Karel; BAZGIER, Václav; VELANKAR, Sameer; BURLEY, Stephen K; KOČA, Jaroslav; ROSE, Alexander s. Mol* Viewer: modern web app for 3d visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 431-437, 6 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab314>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W431/6270780>. Acesso em: 25 out. 2023.

SETTEMBRE, Carmine; ZONCU, Roberto; MEDINA, Diego L; VETRINI, Francesco; ERDIN, Serkan; ERDIN, Serpiluckac; HUYNH, Tuong; FERRON, Mathieu; KARSENTY, Gerard; VELLARD, Michel C. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The Embo Journal*, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1095-1108, 17 fev. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.32>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298007/>. Acesso em: 06 jan. 2024.

SERRA, Ines; STRAVS, Ana; OSÓRIO, Catarina; OYAGA, Maria Roa; SCHONEWILLE, Martijn; TUDORACHE, Christian; BADURA, Aleksandra. Tsc1 Haploinsufficiency Leads to Pax2 Dysregulation in the Developing Murine Cerebellum. *Frontiers In Molecular Neuroscience*, [S.L.], v. 15, p. 1-1, 13 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2022.831687>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35645731/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SLIVA, Katja; SCHNIERLE, Barbara s. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology Journal*, [S.L.], v. 7, n. 1, 21 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-7-248>. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-7-248>. Acesso em: 25 out. 2023.

SUH, Sung-Suk; YOO, Ji Young; NUOVO, Gerard J.; JEON, Young-Jun; KIM, Seokho; LEE, Tae Jin; KIM, Taewan; BAKÁCS, Arianna; ALDER, Hansjuerg; KAUR, Balveen. MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma multiforme. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 109, n. 14, p. 5316-5321, 19 mar. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202465109>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22431589/>. Acesso em: 25 out. 2023.

TRATTNIG, Christa; ÜÇAL, Muammer; TAM-AMERSDORFER, Carmen; BUCKO, Angela; ZEFFERER, Ulrike; GRÜNbacher, Gerda; ABSENGER-NOVAK, Markus; ÖHLINGER, Kristin Anna; KRAITSY, Klaus; HAMBERGER, Daniel. MicroRNA-451a overexpression induces accelerated neuronal differentiation of Ntera2/D1 cells and ablation affects neurogenesis in microRNA-451a-/- mice. *Plos One*, [S.L.], v. 13, n. 11, 21 nov. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0207575>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0207575>. Acesso em: 25 out. 2023.

THE UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 506-515, 5 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1049>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D506/5160987>. Acesso em: 21 ago. 2020.

THOREEN, Carson C.; CHANTRANUPONG, Lynne; KEYS, Heather R.; WANG, Tim; GRAY, Nathanael S.; SABATINI, David M.. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, [S.L.], v. 485, n. 7396, p. 109-113, maio 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11083>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347774/>. Acesso em: 25 out. 2023.

TSANG, Chi Kwan; LIU, Hui; ZHENG, X.F. Steven. MTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle*, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 953-957, mar. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.9.5.10876>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3023410/#:~:text=In%20the%20present%20study%2C%20we,%2C%20HEK293%20and%20%CE%B2%2DTC6..> Acesso em: 25 out. 2023.

VAN SLEGTHENHORST, Marjon; NELLIST, Mark; NAGELKERKEN, Bas; CHEADLE, Jeremy; SNELL, Russell; OUWELAND, Ans van Den; REUSER, Arnold; SAMPSON, Julian; HALLEY, Dicky; SLUIJS, Peter van Der. Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Human Molecular Genetics*, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 1053-1057, 1 jun. 1998. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/7.6.1053>. Disponível em: <https://academic.oup.com/hmg/article/7/6/1053/2896767>. Acesso em: 21 ago. 2020.

VÉZINA, Claude; KUDELSKI, Alicia; SEHGAL, S. N.. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal Of Antibiotics*, [S.L.], v. 28, n. 10, p. 721-726, 1975. Japan Antibiotics Research Association. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.28.721>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/28/10/28_10_721/_article. Acesso em: 25 out. 2023.

VINSLAND, Elin; BASKARAN, Pranetha; MIHAYLOV, Simeon R.; HOBBS, Carl; WOOD, Hannah; BOUYBAYOUNE, Ihssane; SHAH, Kriti; HOUART, Corinne; TEE, Andrew R.; MURN, Jernej. The zinc finger/RING domain protein Unkempt regulates cognitive flexibility. *Scientific Reports*, [S.L.], v. 11, n. 1. 11 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-95286-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-95286-y>. Acesso em: 25 out. 2023.

WENTINK, M; NELLIST, M; HOOGEVEEN-WESTERVELD, M; ZONNENBERG, B; KOLK, D van Der; VAN ESSEN, T; PARK, S-M; WOODS, G; COHN-HOKKE, P; BRUSSEL, W. Functional characterization of the TSC2 c.3598C>T (p.R1200W) missense mutation that co-segregates with tuberous sclerosis complex in mildly affected kindreds. *Clinical Genetics*, [S.L.], v. 81, n. 5, p. 453-461, 10 mar. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01648.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0004.2011.01648.x>. Acesso em: 25 out. 2023.

XU, Lixia; WU, Qiaoli; YAN, Hua; SHU, Chang; FAN, Weijia; TONG, Xiaoguang; LI, Qingguo. Long noncoding RNA KB-1460A1.5 inhibits glioma tumorigenesis via miR-130a-3p/TSC1/mTOR/YY1 feedback loop. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 525, p. 33-45, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2021.10.033>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34728310/>. Acesso em: 25 out. 2023.

YANG, Haijuan; RUDGE, Derek G.; KOOS, Joseph D.; VAIDIALINGAM, Bhamini; YANG, Hyo J.; PAVLETICH, Nikola P.. MTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, [S.L.], v. 497, n. 7448, p. 217-223, maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12122>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4512754/>. Acesso em: 02 maio 2024.

YANG, Huirong; YU, Zishuo; CHEN, Xizi; LI, Jiabei; LI, Ningning; CHENG, Jiaxuan; GAO, Ning; YUAN, Hai-Xin; YE, Dan; GUAN, Kun-Liang. Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. *Nature Communications*, [S.L.], v. 12, n. 1, 12 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20522-4>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7804450/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ZAYTSEVA, Yekaterina Y.; VALENTINO, Joseph D.; GULHATI, Pat; EVERS, B. Mark. MTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Letters*, [S.L.], v. 319, n. 1, p. 1-7, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.005>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383512000304?via%3Dihub>. Acesso em: 25 out. 2023.

ZHANG, Yun; GODAVARTHI, Jyotsna D.; WILLIAMS-VILLALOBO, Abie; POLK, Shahrazad; MATIN, Angabin. The Role of DND1 in Cancers. *Cancers*, [S.L.], v. 13, n. 15, p. 3679, 22 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13153679>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8345090/>. Acesso em: 25 out. 2023.

ZHAO, Min; LI, Peiyi; QIAO, Dan; HUA, Siyi; YUE, Qiyu; DAI, Yuxin; HUANG, Yuqiu; JIANG, Jiabin; YIN, Huiting; LI, Meng. N6-methyladenosine modification of TSC1 mRNA contributes to macrophage polarization regulated by Coptisine in DSS-induced ulcerative colitis. *Phytomedicine*, [S.L.], v. 122, p. 155153, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155153>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711323005123?via%3Dihub>. Acesso em: 06 jan. 2024.

Anexos

Anexo 1: BLASTN alinhando as 3' UTR das sequências de referência de *TSCI* humano (NM_000368.5) e de camundongo (NM_001289575.2).

```
Program: BLASTN
Query: Homo sapiens TSC complex subunit 1 (TSC1), transcript variant 1, mRNA ID:
NM_000368.5(nucleic acid) Length: 4886
Subject:Mus musculus TSC complex subunit 1 (Tsc1), transcript variant 1, mRNA ID:
NM_001289575.2(nucleic acid) Length: 3994
```

```
Sequences producing significant alignments:
Description: Mus musculus TSC complex subunit 1 (Tsc1), transcript variant ...
Scientific Name: Mus musculus
Common Name: house mouse
Taxid: 10090
Max Score: 235
Total Score: 465
Query cover: 24%
E-Value: 2e-64
Per. Ident: 77.70
Acc. Len: 7694
Accession: NM_001289575.2
```

Alignments:

```
>Mus musculus TSC complex subunit 1 (Tsc1), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: NM_001289575.2 Length: 7694
```

Range 1: 3701 to 4392

```
Score:230 bits(124), Expect:1e-62,
Identities:567/766(74%), Gaps:89/766(11%), Strand: Plus/Plus
```

```
Query 3718 GATGGTCAATCAGTGTAACTTGCAT-ATTGTTGGCACAGAACAGGAGGTGTAATGCAC 3776
|| ||| | ||||| | ||| | ||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3701 GAGGGTCTGTCAGTGTTCATTTGCGTCTTTGTTCGGCACAGAACAGAAGGTGTAATGCAC 3760

Query 3777 GTTTCAAAGCTTTCCTGTTTCCAGGGTCTGAGTGCAAGTTCATGT---GTGGAAATGGGA 3833
| || | || | ||||| ||||| || | || | ||| ||||| |||||
Sbjct 3761 G-GTCTAGGC-TT-CTGTTTCCAGGGTCTGAG--CAGCTGCTTGTGCGGTGGGAATGGGA 3815

Query 3834 CGGAGGTCCCTTGGACAGCTGACTGAATGCAGAACGGT---TTTTGGATCTGGCATTGAA 3890
| ||||| |||| | || | | | || | ||||| ||||| |||||
Sbjct 3816 CAGAGTCCCTTCTGACAGAGGGCAGAGAGTGGGATGGTGGCTTTTGGTCTGGCATTGA- 3874

Query 3891 ATGCCTCTTGACCTTCCCCTCCACCCGCCCTAACCCCTCTCATTTACCTCGCAGTGTGT 3950
| | ||| |||| || | |||| | ||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 3875 --GACGCTT--CCTTCACCT-----C-CCCT-A--GCCTTTCATTTACCCAGCAGTGTGT 3921

Query 3951 TCTAATCCAAGGGCCAGTTGGTGTTCCTCAGTAGCTTTACTTTCTTCCCTTCCCCCCCAA 4010
|| | | | | || | | || ||||| ||| ||| | ||| |||||
Sbjct 3922 ACTGAT-----TG--A---GG-G-T-CT--GT-GCTTCACTCTC-TCC--T-CCCACCAA 3961
```

```

Query 4011 ATGGTTGCGTCCTTTGAACCTGTGCAATATGAGGCCAAATTTAATCTTTGAGTCTAACAC 4070
          |||||  |||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||  |||  || |
Sbjct 3962 ATGGTTATGTCATTTGAACCTGTGCAATATGAGGCCAAATTTTCATCTTTGGGTCCAATAT 4021

Query 4071 ACCACTTTCTGCTTTCCCGAAGTTCAGATAACTGGGTTGGCTCTCAATTAGACCAGGTAG 4130
          ||||  |||||||||||  ||  |||||||  |||||||  |||||||  |||||||  |
Sbjct 4022 GCCAC--TCTGCTTCTCTGAGGTTTCAGACAACCTGGG-TGGCTCTTGGGTAGACCAGGCAA 4078

Query 4131 TTTGTTGCATTGCAGGTAAGTCTGGTTTTGTCCCTTCCAGGAGGACATAGCCTGCAAAGC 4190
          |  ||  |||  |||||||||||  |  |||||||||||  |||||||  |  |||||  ||  |||
Sbjct 4079 CTAGTGGCACTGCAGGTAAGTCCAG-TTTGTCCCTTGCAGGAGGATAGAGCCTACAGAGC 4137

Query 4191 TGGTTGTCTTTACATGAAAGCGTTTACATGAGACTTCCGACTGCTTTTTTGATTCTGAA 4250
          ||  ||  |||||||  |  ||||  |  |  |  ||  |||||  |||||  |||||||
Sbjct 4138 TG----TCTTTACA-G-GAGCG--T---T----C---CC-ACTGC--TTTTGGTCTGAA 4176

Query 4251 GTTCAGCATCTAAAGCAGCAGGTCTAGAAGAACAAC-GGTTTATTCATACT-TGCATTCT 4308
          ||||||||||||  ||  |||  ||||  ||  |  |||  ||  |  |||  ||  |||  || |
Sbjct 4177 GTTCAGCATCTAAGCCA-CAGATCTAG-AG-A-AACTGGCTCACTCA-CCTCTGCCTTTT 4231

Query 4309 TTTGGCAGTTCTGATAAGCTTCCCTAGAAAGTTCTGTGTAAACAGAAGCCTGTTTCAGAAA 4368
          |||||||  |||||||  |  |||||||  |||||||  |||  |  ||  |||  ||  |
Sbjct 4232 CTTGGCAGCTCTGATATGATTCCCTAGAAAGTTCTGTGAGAATACCAG-CTGCTTT-GACA 4289

Query 4369 TCTGGAGCTGGCACTGTGGAGACCACAC-ACC----CT-TTGGGAAAGCTCTTGTCTCTT 4422
          ||  ||  ||  |||||||||||  |||||  ||  ||  ||  |||||||||||  |  |
Sbjct 4290 -GTGCAGTTGCCACTGTGGAGGCCACACTGCCTTAACCTCTCTGGAAAGCTCTT-ACCCCT 4347

Query 4423 CTTCCCCACTACCTCTTATTTATTTGGTGTGTTGCTTGAATGCTGG 4468
          |  |  |||||||||||||||||||||||||||||||||||  |||||||||||||||
Sbjct 4348 C-TGCCCCACTACCTCTTATTTATTTGGTATTTGCTTGAATGCTGG 4392
    
```

Range 2: 7267 to 7694

Score:235 bits(127), Expect:2e-64,
 Identities:352/453(78%), Gaps:45/453(9%), Strand: Plus/Plus

```

Query 8163 TTTTGCCTAGGAAGAATCAGTAATCACTTTTCAGAAGACTTCTATGGACCACAAATATA 8222
          ||||||||||||||||  |||  |  ||||  ||||  |||  |  |||||||||||  ||
Sbjct 7267 TTTTGCCTAGGAAGATCAATGGTCCACCTTCATGAGA---C--TGGACCACAAACATG 7321

Query 8223 TTACGGAGGAACAGATTTTGCTAAGACATAATCTAGTTTATAACTCAATCATGAATGAA 8282
          |  |  |||||  |||  ||||||||||||||||  |  |||||||||||  |||||||  |||||
Sbjct 7322 ATGCAGAGGAGCAGGTTTGTCTAAGACATAGTTTATGTTTATAA-TCAATCATGGATGAA 7380

Query 8283 CCATGTGTGGCAAACCTTG-CAGTTTAA----AGG-G-G----TCCCATCAGTG-AAA-GA 8329
          ||  |  ||||  |||||  |||||||  ||  ||  |  |||||||||||  |||  ||
Sbjct 7381 GCAGATATGGCTAACTTGGGAGTTTAAAGGGGGGGTGTGATATTCCCATCAGTGAAAACGA 7440

Query 8330 AACTGATTTTTTTTAAACGGACTGCTTTT-AGTTAAATTGAAGAAAGTCAGCTCTTGTCAA 8388
          |  |  |||||  ||  |  ||||  ||||  ||  ||  |  |||||  |||  ||||
Sbjct 7441 ATCAGATTTTAAAAAAAAAAAAAATTTTAGTTCAA-TG--G-AAGTCA---CTTCTCAA 7493

Query 8389 AAGGTCTAAACTTTCCCGCCT---CA--ATCCTAAAAGCATGTC-AACAATCCACATCAG 8442
          |||||  ||||  |||||  |  |  ||  |||||||||||  |||||||  |||||
Sbjct 7494 AAGGTTTAAATGTTCCCACTAAGATATGATCTTAAAAGCATGTCAAACAATCCAAATCAG 7553
    
```


Anexo 2: FASTA da sequência peptídica usada na predição de dobramento de UNK (Q9C0B0).

```
>sp|Q9C0B0|UNK_HUMAN RING finger protein unkempt homolog OS=Homo sapiens  
OX=9606 GN=UNK PE=1 SV=2
```

```
MSKGP GPGGSAASSAPPAATAQVLQAQPEKPQHYTYLKEFRTEQCPLFVQHKCTQHR  
PYTCFHWHFVNQRRRRSIRRRDGTFNYS PDVYCTKYDEATGLCPEGDECPFLHRTTG  
DTERRYHLRYYKTGICIHETDSKGNCTKNGLHCAFAHGPHDLRSPVYDIRELQAMEA  
LQNGQTTVEGSIEGQSAGAASHAMIEKILSEEPRWQETAYVLGNYKTEPCKKPPRLCR  
QGYACPYHNSKDRRRSPRKHKYRSSPCPNVKHGDEWGDPGKCENGDACQYCHTR  
TEQQFHPEIYKSTKCNDMQQSGSCPRGPFCAFAHVEQPPLSDDLQSSAVSSPTQPGPV  
LYMP SAAGDSVPVSPSSPHAPDLSALLCRNSSLGSPSNLCGSPPGSIRKPPNLEGIVFPG  
ESGLAPGSYKKAPGFEREDQVGAEYLKNFKCQAKLKPHSLEPRSQEQLLQPKQDML  
GILPAGSPLTSSISSITSSLAATPPSPVGTSSVPGMNANALPFYPTSDTVESVIESALDDL  
DLNEFGVAALEKTFDNSTVPHPGSITIGGSLQSSAPVNIPGSLGSSASFHSASPSPPVSL  
SSHFLQQPQGHLSQSENTFLGTSASHGSLGLNGMNSSIWEHFASGSFSPGTSPAFLSGP  
GAAELARLRQELDEANSTIKQWEESWKQAKQACDAWKKEAEEAGERASAAGAECE  
LAREQRDALEVQVKKLQEELERLHAGPEPQALPAFSDLEALSSTLYSLQQLRAHLE  
QVDKAVFHMQS VKCLKCQEQKRAVLPCQHAALCELCAEGSECPICQP GRAHTLQS
```